



## اثر کو-میکروانکپسولاسیون آلزینات با پکتین بر زنده ماندن باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنسوس تحت شرایط شبیه سازی شده گوارش و بررسی خصوصیات فیزیکی شیمیایی میکروکپسول های تولیدی

مریم تاج آبادی ابراهیمی<sup>۱\*</sup>، فرشته ناظمی هرندی<sup>۲</sup>، تارا میرزائی<sup>۱</sup>، زهرا زیاری<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

<sup>۳</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۰

### چکیده

تکنیک کو-میکروانکپسولاسیون روشی رایج به منظور افزایش کارایی پروبیوتیک ها در حین فرآیند تولید و هم چنین رهايش کنترل شده و هدفمند آن ها در دستگاه گوارش است. بنابراین در پژوهش حاضر جهت بهبود قابلیت زنده ماندن میکروارگانيسم ها در شرایط نامساعد گوارش، باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنسوس در پلیمرهای سدیم آلزینات و ماده کو-میکروانکپسوله کننده پکتین با تکنیک اکستروژن انکپسوله و در ادامه به روش انجمادی خشک شد. سپس نمونه ها در شرایط شبیه سازی شده معده (آنزیم پپسین، pH= ۱/۸) و روده کوچک (نمک صفراوی (بایل اگرالات) و آنزیم پانکراتین و pH = ۶/۸) مجموعاً به مدت ۵ ساعت قرار گرفت. نمونه های بهینه (کو-میکروکپسول) و کنترل (سلول آزاد و میکروکپسول) به منظور بررسی ویژگی های فیزیکی شیمیایی توسط آنالیزهای مشخصه یابی اعم از FE-SEM، XRD و FTIR سنجش شدند. پیرو نتایج بدست آمده، میزان بقای سلول های آزاد پس از عبور از محیط شبیه سازی شده گوارش به ۶۲/۵۲٪ کاهش یافت؛ در صورتی که قابلیت زیستی کو-میکروکپسول ها و میکروکپسول ها به ترتیب به ۸۳/۴۹٪ و ۷۴/۸۳٪ رسید. بنابراین شایان ذکر است به دلیل اثر هم افزایی مواد زیست فعال مورد استفاده، عملکرد پروبیوتیک کو-میکروانکپسوله به مراتب بسیار بالاتر از حد قابل قبول بود. بطور خلاصه این مطالعه نشان داد شبکه کو-میکروانکپسولاسیون می تواند به عنوان سامانه ای جدید در حفظ و نگهداری پروبیوتیک ها در صنعت غذای فراسودمند مورد استفاد قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** پروبیوتیک، انکپسولاسیون، کو-میکروکپسول، دستگاه گوارش.

\* ebrahimi\_mt@yahoo.com

قبل از انتخاب تکنیک انکپسولاسیون، باید جنبه‌های مختلفی در نظر گرفته شود. انتخاب یک روش مناسب به پارامترهای مختلفی از جمله ماهیت پروبیوتیک‌ها، شرایط عملیاتی روش انکپسولاسیون، خواص مواد زیستی مورد استفاده، اندازه ذرات مورد نیاز برای تحویل‌رسانی پروبیوتیک‌ها بدون داشتن تأثیرات منفی بر ویژگی‌های محصول، مکانیسم رهاسازی و نرخ رهایش پروبیوتیک‌ها، هدف انکپسولاسیون، کاربرد محصول انکپسوله شده، شرایط نگهداری و در نهایت هزینه تولید بستگی دارد. روش‌های انکپسولاسیون شامل تثبیت (اکستروژن<sup>۲</sup>، امولسیون<sup>۳</sup>، کواسرویشن<sup>۴</sup> و الکتروریسی<sup>۵</sup>) و روش‌های مبتنی بر خشک کردن (خشک کردن انجمادی<sup>۶</sup>، خشک کردن پاششی<sup>۷</sup>، خشک کردن انجمادی پاششی<sup>۸</sup> و خشک کردن بستر سیال<sup>۹</sup>) می‌باشند. در این میان، روش اکستروژن (ژل شدن یونی خارجی)<sup>۱۰</sup> یکی از روش‌های راحت و پربازده بوده که در حوزه انکپسولاسیون پروبیوتیک‌ها مورد توجه فراوان پژوهشگران و صنعتگران قرار دارد. این روش بر اساس به دام اندازی هسته درون دانه‌های هیدروژلی عمل می‌کند. این سامانه انکپسولاسیون، بازده‌های مختلفی را در محافظت از پروبیوتیک‌ها نشان داده است. اصلاحات در این سامانه بصورت پوشش دهی دانه‌ها (کپسول‌ها) با پلیمرهای دیگر و یا ترکیب پلیمر دیگر درون شبکه پلیمر اصلی می‌باشد. استفاده از حامل‌های مناسب برای انکپسولاسیون باکتری‌ها حائز اهمیت است. بدین منظور از ترکیبات مختلفی اعم از پروتئین‌های گیاهی و حیوانی، پلی ساکاریدهای گیاهی،

## مقدمه

تولید محصولات پروبیوتیک از دیرباز در جوامع بشری رونق داشته است و امروز بدلیل کشف خواص موثر آن بر گوارش انسان، بازار آن روز به روز گسترش یافته است. ماهیت پروبیوتیک‌ها به گونه‌ای است که در برابر شرایط نامساعد محیطی نظیر اسیدیته بالا و pH پایین، نمک‌های صفاوی، انجماد شدید یا خشک شدن انجمادی، اکسیژن مولکولی، خشک شدن پاششی، باکتری فاژها و ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی بسیار حساس هستند که کاربرد آن‌ها را با محدودیت روبرو کرده است. بنابراین فناوری انکپسولاسیون به عنوان نوین ترین شیوه‌ها، با هدف محافظت از پروبیوتیک‌ها و کنترل انتشار آن‌ها در دستگاه گوارش اثر قابل ملاحظه‌ای در این ارتباط دارد.

تاکنون روش‌های مختلفی به منظور انکپسولاسیون و تثبیت پروبیوتیک‌ها معرفی شده‌اند که هر کدام دارای نقاط قوت و معایب خاص خود هستند. بنابراین، دستیابی به رویکردی کم هزینه با کارایی بالا برای حفظ جمعیت فعال پروبیوتیک در زمان نگهداری و هم‌چنین در محیط‌های غذایی و گوارشی موضوعی است که امروزه مطرح و مورد حائز اهمیت است [۱-۳].

<sup>7</sup> Spray drying

<sup>8</sup> Spray-Freeze drying

<sup>9</sup> Fluid bed drying

<sup>10</sup> External ionic gelation

<sup>2</sup> Extrusion

<sup>3</sup> Emulsion

<sup>4</sup> Coacervation

<sup>5</sup> Electrospinning

<sup>6</sup> Freeze drying

پلیمر مورد توجهی به منظور انکپسولاسیون و رهایش هدفمند داروها می باشد. بعضی از بلوک های گالاکتورونیک اسید موجود در پکتین استری شده اند که بر حسب درجه ای استری شدن (درجه دمتیلاسیون<sup>11</sup> (DM)) به دو نوع متوکسیل بالا<sup>12</sup> (HM) و متوکسیل پایین<sup>13</sup> (LM) تقسیم می شوند. ساختار گالاکتورونیک اسید پکتین مشابه با گلوکورونیک اسید و مانورونیک اسید در آلژینات می باشد که قابلیت ژل شدن نوع HM آن وابسته به pH و نوع LM آن به راحتی توانایی تشکیل شبکه اتصال عرضی با یون کلسیم را همانند آلژینات دارا می باشد [5]. این مکانیسم شباهت زیادی به پوسته تخم مرغ دارد [6]. شایان ذکر است پکتین به آنزیم های معده و روده مقاوم است اما می تواند به سرعت توسط میکروبیوتای روده تخمیر شود، بنابراین آزادسازی کنترل شده پروبیوتیک ها در روده را تسهیل می کند. هم چنین پکتین، یک پری بیوتیک موثر است که می تواند رشد و تحمل اسید را افزایش دهد و بقای پروبیوتیک های کپسوله شده را بهبود بخشد [6, 7].

شایان ذکر است کو میکروانکپسولاسیون یک نوع روش انکپسولاسیون است که به دلیل اثر هم افزایی<sup>14</sup> دو یا چند ماده زیست فعال مورد استفاده، عملکرد مواد محصور شده را افزایش می دهد [5]. از این رو در سال های اخیر، توجه زیادی به انکپسولاسیون همزمان پروبیوتیک ها همراه با آلژینات و مواد دیگر تحت عنوان کو-انکپسولیتور شده است. با توجه به موارد فوق، این مطالعه با هدف ارزیابی اثر کو-میکروانکپسولاسیون لاکتوباسیلوس رامنوسوس با سدیم آلژینات و پکتین بر زنده ماندن و پایداری پروبیوتیک ها در شرایط شبیه سازی شده گوارش و هم چنین بررسی خصوصیات میکروکپسول های سنتز شده انجام شد.

حیوانی، میکروبی و دریایی و هم چنین پلیمرهای مصنوعی استفاده می شود [3]. در بین پلیمرهای کربوهیدراتی مورد استفاده، سدیم آلژینات به دلیل ماهیت غیر سمی، سهولت در تولید میکروکپسول های منسجم، زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و هم چنین دسترسی آسان، به عنوان رایج ترین ماده زیستی برشمرده می شود. آلژینات، یک پلی ساکارید طبیعی مشتق شده از اسید آلژینیک با بار منفی بوده که در دیواره سلولی جلبک های قهوه ای حضور داشته و تقریباً ۳۰ تا ۶۰ درصد با اسید آلژینیک همراه می باشد. سدیم آلژینات به دلیل داشتن خاصیت ژل کنندگی و غلیظ کنندگی به غیر از صنایع غذایی در صنایع داروسازی نیز مورد استفاده قرار می گیرد [4]. مونومرهای آلژینات دارای گروه عاملی کربوکسیل بوده و هر گروه کربوکسیل آن با کاتیون های موجود در محلول همراه می شود. این همراهی باعث ایجاد شبکه اتصال عرضی با کاتیون های دارای دو بار مثبت می شود که ژل شدن یونی را سبب می شود. از لحاظ شیمی، آلژینات کوپلیمری متشکل از  $\beta$ -D-مانورونیک اسید (M) و L- $\alpha$  گلوکورونیک اسید (G) می باشد. نسبت M و G مهم ترین پارامتر بین آلژینات های مختلف بوده و بطور زیادی بر روی خواص این پلیمر تاثیر گذار است. پکتین یک بیوپلیمر طبیعی، آب دوست و غیر سمی است. این ماده از ساختارهای ژلاتینی موجود در میوه و سبزیجات بدست می آید. پلیمر مورد نظر یک هتروپلی ساکارید آنیونی است که از نظر ساختاری، از تعدادی بلوک D-گالاکتورونیک اسید که توسط پیوندهای گلیکوزیدی آلفا ۱ و ۴ به یکدیگر متصل شده اند تشکیل شده است. به دلیل فراوانی، قیمت ارزان، در دسترس بودن، داشتن بار منفی، زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و هم چنین فرم متوکسیله شده ی کم آن،

<sup>13</sup> Low methoxyl

<sup>14</sup> Synergistic

<sup>11</sup> Degree methylation

<sup>12</sup> High methoxyl

## مواد و روش‌ها

## مواد شیمیایی و بیوشیمیایی

لاکتوباسیلوس رامنسوس<sup>۱۵</sup> به عنوان سویه پروبیوتیکی (IBRC-M 11322) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. سدیم آلژینات (ویسکوزیته متوسط) و پکتین (کم متوکسیل) به ترتیب از شرکت‌های سیگما و بی دی اچ تامین شد. هم‌چنین از مواد دیگری در این پژوهش اعم از محیط کشت MRS براث (مرک)، آنزیم پپسین (مرک)، آنزیم پانکراتین (سیگما آلدریچ)، نمک بایل اگزالات (بی دی اچ)، کلسیم کلرید (قطران)، سدیم کلرید (مرک) و تری سدیم سترات (مرک) استفاده شد.

## آماده سازی باکتری پروبیوتیک

باکتری لاکتوباسیلوس رامنسوس به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت استریل MRS براث در دمای ۳۷ °C در انکوباتور تحت شرایط هوازی پیش کشت داده شد تا فعال

شود. در مرحله بعد، باکتری تازه کشت یافته در ۴۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و پس از شستشوی سلول‌ها با سدیم کلرید ۰/۹٪، مجدداً باکتری‌ها سانتریفوژ شد. سپس سوسپانسیون باکتریایی بدست آمده به روش کلنی کانت در محیط کشت MRS آگار پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ °C و تحت شرایط هوازی مورد شمارش قرار گرفت. در ادامه، سلول‌های باکتریایی تازه متعاقباً در آزمایشات کو-میکروانکپسولاسیون و میکروانکپسولاسیون استفاده شد یا به عنوان سلول‌های آزاد مورد استفاده قرار گرفت.

## فرآیند کو-میکروانکپسولاسیون باکتری

## پروبیوتیک به روش اکستروژن

روش اکستروژن<sup>۱۷</sup> مطابق بهینه سازی ترکیب درصد میکروکپسول‌های حاوی باکتری، سدیم آلژینات و ماده کو-میکروانکپسوله کننده پکتین بکار برده شد (جدول ۱).

جدول ۱- بهینه سازی ترکیب درصد میکروکپسول‌های پروبیوتیکی.

شماره فرمولاسیون	نوع فرآیند انکپسولاسیون	غلظت پلیمرها (% w/v)	
		پکتین (ماده کو-میکروانکپسوله کننده)	آلژینات
۱	کو-میکروانکپسولاسیون	۰/۵	۲
۲	کو-میکروانکپسولاسیون	۱	۲
۳	کو-میکروانکپسولاسیون	۱/۵	۲
۴	میکروانکپسولاسیون	-	۲

پلیمری در شرایط استریل در مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۲۰۰ rpm در دمای محیط مخلوط شدند. در انجام فرایندهای میکروانکپسولاسیون و کو-میکروانکپسولاسیون، مخلوط حاصله به درون سرنگ استریل منتقل و سپس به محلول کلسیم کلرید ۰/۵ w/v اضافه شد. گرانول‌های کروی و منسجم (میکروکپسول‌ها)، بلافاصله پس از تماس با یون کلسیم تشکیل شدند. مخلوط مورد نظر به مدت حداقل ۳۰

پلیمرهای تشکیل دهنده میکروکپسول‌ها، هر کدام به صورت جداگانه در آب دیونیزه حل شده و پس از استریل شدن با هم مخلوط شدند. باکتری پروبیوتیک پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ °C در محیط کشت MRS براث، با سرعت ۴۰۰۰ rpm طی ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و با استفاده از محلول سالین شستشو داده شد. پس از جداسازی کامل فاز بالایی، سلول‌های باکتری با حجم برابر از محلول‌های

<sup>17</sup> Extrusion

<sup>15</sup> *Lactobacillus rhamnosus*

<sup>16</sup> Saline

منظور تعیین بازده فرآیندهای میکروانکپسولاسیون و کو- میکروانکپسولاسیون از معادله ۱ استفاده شد:

$$\% \text{ زنده مانی} = \frac{N}{N_0} \times 100 \quad (1)$$

در اینجا، N بصورت Log cfu/gr سلول محبوس شده در میکروکپسول و N<sub>0</sub> بصورت Log cfu/gr تعداد سلول اولیه در محیط کشت تعریف می شود. Log cfu/gr برابر با تعداد کلونی های زنده بازای هر گرم می باشد [۸-۱۰].

### بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی میکروکپسول های پروبیوتیکی

به منظور بررسی خصوصیات کو-میکروکپسول های حاوی باکتری - آلژینات - پکتین (نمونه بهینه) و نمونه های کنترل (سلول باکتریایی آزاد و میکروکپسول های حاوی باکتری - آلژینات)، از آنالیزهای مشخصه یابی [۸-۱۰] به شرح زیر استفاده می شود:

#### بررسی مورفولوژی سطح با استفاده از

#### میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیل<sup>۱۸</sup> (FESEM)

به منظور مشاهده و بررسی شکل و ساختار ظاهری نمونه ها (بهینه و کنترل)، از تصاویر FESEM با بزرگنمایی های مختلف استفاده شد. برای این کار، نمونه های خشک شده با استفاده از پوشش نقره آماده شدند. نمونه های آماده شده داخل محفظه دستگاه قرار گرفتند تا با استفاده از پرتو الکترونی، تصاویر مورد نظر گرفته شود.

#### بررسی پیوندهای فیزیکی و شیمیایی با استفاده

#### از طیف سنجی تبدیل فوریه - فرورسوخ<sup>۱۹</sup> (FTIR)

برای بررسی پیوندهای موجود در نمونه ها (بهینه و کنترل)، از طیف سنج FTIR استفاده شد. برای این کار نمونه های خشک

دقیقه در دمای محیط به منظور سفت شدن شبکه نگه داری شد. سپس میکروکپسول های سنتز شده پس از سانتیفیوژ، در حضور پروتکتانت های سرمایشی مختلف اعم از اسکیم میلک و گلوکز به روش انجمادی خشک شدند. در روش اکستروژن (ژله ای شدن یونی)، یون های مثبت کلسیم (Ca<sup>2+</sup>) حاصل از محلول کلسیم کلرید با گروه های منفی کربوکسیلات (COO<sup>-</sup>) گالاکتورونیک اسید موجود در سدیم آلژینات، پیوند الکتروستاتیکی یونی-یونی ایجاد کرده و شبکه ای بسیاری تشکیل می دهد. شایان ذکر است غلظت پلیمر های مورد بررسی در پژوهش حاضر، برگرفته از مطالعات علمی و پری تست های انجام شده می باشد [۸]. پس از انجام آزمایشات بهینه سازی، در نهایت نمونه بهینه (میکروکپسول ها) به منظور ادامه آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت.

#### بررسی زنده مانی میکروکپسول های پروبیوتیکی در طی فرایند

هدف از این مرحله، بررسی زنده مانی میکروکپسول های پروبیوتیکی و در ادامه انتخاب فرمولاسیون بهینه ترکیب درصد دیواره باکتری (مواد انکپسوله کننده) می باشد. بدین منظور، با توجه به گیر افتادن و محبوس شدن هسته (باکتری) در ساختار کروی میکروکپسول ها، ابتدا رهایش هسته انجام شد. لذا ۱ gr میکروکپسول حاوی سلول باکتری پروبیوتیک در ۹ cc محلول سدیم سترات ۳٪ v/w به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر انکوباتور با دور ۱۲۰۰ مخلوط شده تا میکروکپسول ها کاملا باز و سلول های باکتریایی آن آزاد شوند. سپس محتوی موجود در آب مقطر استریل به رقت های مورد نیاز رسانده و شمارش به روش کشت سطحی انجام شد. به عنوان نمونه کنترل از باکتری غیر انکپسوله (سلول آزاد) و میکروکپسول های آلژینات (بدون پکتین) استفاده شد [۸]. به

<sup>19</sup> Fourier Transform Infrared

<sup>18</sup> Field Emission Scanning Electron Microscope

شده پس از مخلوط شدن با KBr بصورت قرص خمیری در آمده و با دستگاه FTIR سنجش شدند.

### بررسی بلورینگی با استفاده از طیف سنجی پراکنش پرتو ایکس<sup>۲۰</sup> (XRD)

برای بررسی ساختارهای بلوری نمونه‌ها (بهینه و کنترل)، از الگوهای XRD استفاده شد. نمونه‌ها با اشعه ی تحت ولتاژ ۴۰ kv و ۴۰ mA توسط دستگاه XRD سنجش شدند.

### آماده سازی محیط شبیه سازی شده ی گوارش

برای تهیه ۱ Lit محیط شبیه‌سازی شده‌ی معده، ۵ gr نمک سدیم کلرید به همراه ۳ gr آنزیم پپسین در ۱ لیتر آب مقطر حل و pH محلول حاصل با هیدروکلریدریک اسید M ۱ روی ۱/۸ تنظیم شد. برای تهیه ۱ Lit محیط شبیه‌سازی شده ی روده ی کوچک، ۱ gr آنزیم پانکراتین به همراه ۰/۵ gr نمک صفرای در محلول فسفات بافر سالین حل و به حجم ۱ Lit رسانده می‌شود. pH این محلول ۷/۴ تنظیم شد [۸-۱۰].

### بررسی رهائش میکروکپسول‌های پروبیوتیکی در

#### سامانه شبیه‌سازی شده گوارش

به منظور بررسی تاثیر میکروکپسول‌ها بر زنده مانی باکتری (نمونه‌های بهینه و کنترل)، نمونه‌های حاوی باکتری بلافاصله پس از سنتز در معرض محیط شبیه سازی شده‌ی گوارش قرار می‌گیرد. بدین منظور، ۱ gr نمونه به ۹ cc محلول شبیه‌سازی شده ی معده داخل ارلن اضافه و در انکوباتور ۳۷ °C با دور

۷۰ به مدت ۲ ساعت انکوباته شد. پس از جداسازی کامل محیط معده و ۲ بار شستشوی نمونه‌ها با سالین استریل بوسیله سانتریفوژ، ۹ cc از محیط شبیه‌سازی شده ی روده به نمونه‌ها اضافه و مجدداً به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ °C با دور ۱۵۰ انکوباته شد. پس از این زمان، عملیات رقیق‌سازی و شمارش باکتری‌ها به روش کشت سطحی انجام گرفت. برای محاسبه ی زنده‌مانی سلول‌ها از معادله ۲ استفاده می‌شود [۸-۱۰].

$$\% \text{ زنده مانی} = \frac{N}{N_0} \times 100 \quad (2)$$

در اینجا، N بصورت Log cfu/gr سلول محبوس شده در نمونه‌ها پس از قرارگیری در محیط گوارش و N<sub>0</sub> بصورت Log cfu/gr تعداد سلول اولیه پس از میکروانکپسولاسیون و کو-میکروانکپسولاسیون تعریف می‌شود. Log cfu/gr برابر با تعداد کلونی‌های زنده بازای گرم می‌باشد.

### تحلیل آماری

تمام آزمایش‌های انجام شده در این طرح، سه بار تکرار شدند. بررسی نتایج حاصل از طراحی آزمایش‌ها و تعیین مدل‌های مناسب ریاضی با استفاده از تحلیل واریانس<sup>۲۱</sup> انجام و با سطح اطمینان<sup>۲۲</sup> ۹۵٪ گزارش شد.

### نتایج

#### بازده فرآیند میکروانکپسولاسیون و کو-

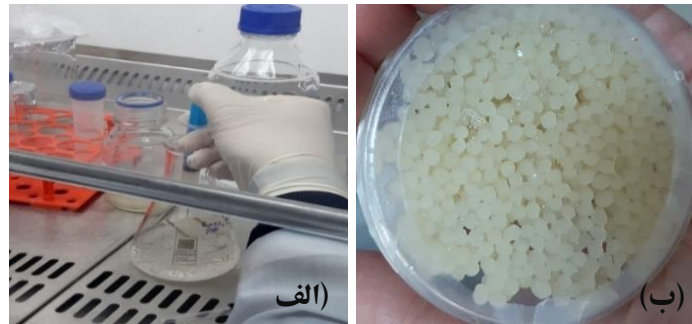
#### میکروانکپسولاسیون

فرآیند انکپسولاسیون طی ۴ فرمولاسیون مختلف به شرح جدول ۱ و شکل ۱ انجام شد.

<sup>22</sup> Confidence Level

<sup>20</sup> X-ray Diffraction

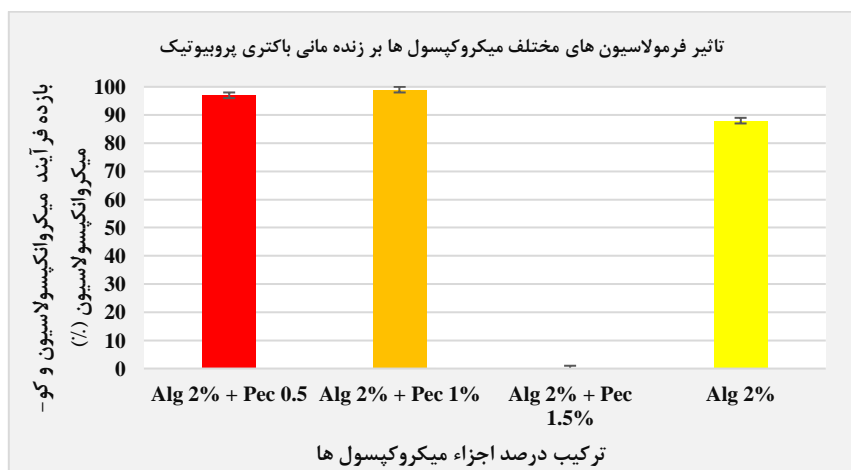
<sup>21</sup> Analysis of Variance (ANOVA)



شکل ۱- تصویر آزمایشگاهی مراحل انجام فرایند انکپسولاسیون (الف) و مورفولوژی کپسول های مرطوب (ب).

فرمولاسیون ۱ (آلژینات ۲٪ + پکتین ۰/۵٪) به علت داشتن دیواره سلولی با غلظت بالاتر، زنده مانی بیشتری از خود نشان داد و این بیانگر این امر می باشد که با افزایش غلظت مواد انکپسوله کننده، بازدهی فرآیند کو-میکروانکپسولاسیون بهتر حفظ می شود. لذا در مقایسه با نمونه کنترل، فرمولاسیون ۲ به عنوان نمونه بهینه انتخاب و برای آزمایشات اصلی مورد استفاده قرار گرفت. هم چنین شکل (۱-ب) شمایی از کو-میکروکپسول های تازه سنتز شده را نشان می دهد ( $P_{value} < 0.05$ ). نمونه های موردنظر در فرم مرطوب دارای اندازه ای در محدوده  $1200 \mu m$  الی  $1700 \mu m$  و نمونه های خشک آن در رنج  $300 \mu m$  الی  $500 \mu m$  بودند [۸].

مطابق داده های شکل ۲ این نتیجه حاصل شد که استفاده از پکتین به عنوان ماده کو-میکروانکپسوله کننده با غلظت w/v ۱/۵٪، موجب ایجاد ویسکوزیته بیش از اندازه در محلول پلیمری حاوی سدیم آلژینات (فرمولاسیون های ۳: آلژینات ۲٪ + پکتین ۱/۵٪) شده و در ادامه باعث عدم تزریق محلول پلیمری فوق در ماده کراس لینک کننده کلسیم کلرید می شود. بنابراین پیرو شواهد، فرایند کو-میکروانکپسولاسیون در فرمولاسیون مذکور با عدم موفقیت همراه شد. از این رو، از ادامه آزمایشات حذف شد. از طرفی دیگر، شایان ذکر است فرمولاسیون ۲ (آلژینات ۲٪ + پکتین ۱٪) نسبت به



شکل ۲- تاثیر فرمولاسیون های مختلف میکروکپسول ها بر زنده مانی پروبیوتیک طی فرآیندهای انکپسولاسیون ( $P_{value} < 0.05$ ).

شکل ۳ شمایی از تصاویر میکروسکوپی نمونه بهینه (کو-میکروکپسول های حاوی باکتری - سدیم آلژینات - پکتین : فرمولاسیون ۲) و نمونه های کنترل (سلول باکتریایی آزاد و هم چنین میکروکپسول های حاوی باکتری - آلژینات) را

### بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی میکروکپسول -

#### های پروبیوتیکی

#### بررسی مورفولوژی نمونه ها



نشان می دهد. پیرو تصاویر، اثری از باکتری‌های پروبیوتیک بر سطح کو-میکروکپسول‌ها دیده نشد که نشان از موفقیت آمیز بودن فرآیند کو-میکروانکپسولاسیون می‌باشد. از دیگر نکات حائز اهمیت می‌توان به کاهش نفوذپذیری جداره‌های کو-میکروکپسول‌های سنتز شده اشاره کرد زیرا باتوجه به منابع علمی، هرچه این سطوح کروی‌تر و دارای شکاف کمتر باشند بهتر می‌باشد و بازده میکروانکپسولاسیون بیشتر حفظ می‌شود. شایان ذکر است کو-میکروکپسول‌های پژوهش حاضر در ابتدا بصورت ذرات کروی مسطح بود و بعد از خشک شدن، دارای سطوح چروکیده و متقعر شد. علت این پدیده ناشی از اثرات منفی فرآیند خشک کردن انجمادی می‌باشد که بر مورفولوژی سطح نمونه‌ها تأثیرات جزئی گذاشته است [۸، ۱۱].

### بررسی گروه‌های عاملی نمونه‌ها

به منظور بررسی تراکنش بین پلیمرها و هسته (باکتری پروبیوتیک)، طیف سنجی FTIR مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۴). آنالیز مورد نظر مربوط به نمونه بهینه (کو-میکروکپسول‌های حاوی باکتری - سدیم آلژینات - پکتین) و نمونه‌های کنترل (سلول آزاد) و (میکروکپسول‌های حاوی باکتری - آلژینات) می‌باشد. پیرو مقایسه‌ی نمونه بهینه با نمونه‌های کنترل این نتیجه حاصل شد ساختارهای پلی ساکاریدی (آلژینات به عنوان پلی ساکارید طبیعی و پکتین به عنوان یک هتروپلی ساکارید آنیونی) به دلیل مشابه بودن در پیوندها، معمولاً در نواحی خاصی دارای طیف‌های FTIR یکسان هستند. پیک مشاهده شده در طول موج  $cm^{-1}$  ۳۵۴۹/۲۵ در طیف‌سنجی نمونه بهینه مربوط به کشش پیوندی O-H می‌باشد. ارتعاشات کششی مربوط به پیوند متقارن و نامتقارن آلفاتیکی C-H در عدد موج  $cm^{-1}$  ۲۹۲۹/۴۸ دیده می‌شود. عدد موج  $cm^{-1}$  ۱۶۳۷/۸۱ پیک ارتعاشی کششی نامتقارن پیوند COO- و طول موج  $cm^{-1}$

۱۴۶۱/۵۶ مربوط به پیک ارتعاشی کششی متقارن گروه کربوکسیل COO- است. عدد موج  $cm^{-1}$  ۱۱۰۲/۵۸ نیز به مربوط به کشش پیوند C-O می‌باشد. لازم بذکر است، در میکروکپسول‌های مورد نظر پیوند کششی C-O در گروه کربوکسیل مربوط به پکتین می‌باشد. پیک‌های مربوط به گروه مونوساکارید موجود در پلی ساکاریدها در ناحیه  $cm^{-1}$  ۱۲۰۰-۸۰۰ ظاهر می‌شود. مطالعات انجام شده روی دیواره سلولی باکتری‌ها نشان داد که حضور باکتری در میکروکپسول‌های سنتز شده منجر به ظهور دو پیک مهم در محدوده عدد موج  $cm^{-1}$  ۱۵۰۰-۱۶۰۰ و ۱۰۰۰-۱۱۰۰ شده است که به ترتیب نشان‌دهنده‌ی گروه‌های آمیدی و فسفات در دیواره سلولی باکتری می‌باشد. بطور کلی شایان ذکر است، تغییر شدت برخی از پیک‌ها و باریک تر شدن پیوندهای گروه عاملی نشان می‌دهد که باکتری درون شبکه ی آلژینات و پکتین احاطه شده و اتصال عرضی آلژینات با یون کلسیم باعث جابجایی عدد موج‌های مورد نظر شده است [۸، ۱۲، ۱۳].

### بررسی بلورینگی نمونه‌ها

با استفاده از اطلاعات بدست آمده از الگوهای XRD می‌توان به بلوری یا آمورف (غیر بلوری) بودن ساختار ترکیب اجزاء کو-میکروکپسول‌های حاوی باکتری، سدیم آلژینات و پکتین پی برد (شکل ۵). مطابق با مطالعات علمی، الگوی XRD مربوط به پلیمر سدیم آلژینات، بیانگر ساختار بلوری می‌باشد. پکتین، دارای یک الگوی کاملاً خمیده و فاقد ساختار بلورین (قله تیز) است که اثبات می‌کند پلیمر مربوطه دارای ساختار آمورف (بی شکل) است. با مقایسه ی الگوهای پراش نمونه بهینه و کنترل نسبت به پلیمرهای خالص و باکتری آزاد، این نتیجه حاصل شد که ساختار کریستالی آلژینات به دلیل داشتن مقدار قابل توجه از کل غلظت میکروکپسول‌ها (۲٪) بر روی ساختار نمونه تأثیر غالبی داشته و ساختار بلوری



مانی باکتری های فعال کو-میکروانکپسوله شده پس از طی کردن محیط تنش زای اسیدی-بازی گوارش به % ۸۳/۴۹ برسد در حالی که در نمونه های کنترل (میکروکپسول ها و باکتری های آزاد) این مقدار به ترتیب به % ۷۴/۸۳ و % ۶۲/۵۲ رسید ( $P_{value} < 0.05$ ). به عبارتی دیگر کو میکروکپسول ها اختلاف ۳/۵ سیکل لگاریتمی با سلول های آزاد و ۱ سیکل لگاریتمی با میکروکپسول ها را نشان می دهد. بنابراین تعداد سلول های زنده باکتری کو-میکروانکپسوله شده پس از عبور از محیط معده، پروتئازها و املاح صفراوی روده به مراتب بالاتر از حد قابل قبول و استانداردهای پروبیوتیک بود و نسبت به نمونه های کنترل از اختلاف معنادار برخوردار است؛ از این رو می تواند مزایای سلامت بخشی را برای میزبان به آسانی فراهم کند (شکل ۶ و جدول ۲).

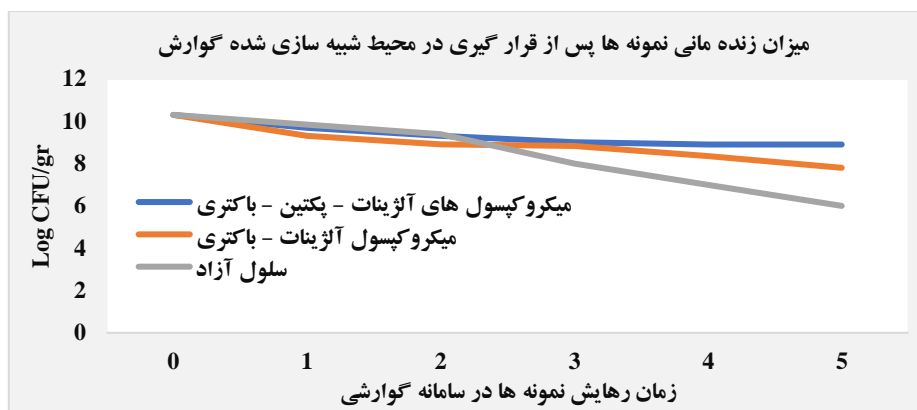
این پلیمر تا حدودی حفظ شده است. در مجموع پس از کو-میکروانکپسولاسیون باکتری با پلیمرهای مربوطه، تعداد و شدت برخی از پیک ها تغییر کرده است که نشان دهنده پیوند بین پلیمرها با باکتری و اتصالات عرضی آلژینات و پکتین با یون کلسیم بوده که باعث ایجاد استحکام بیشتر شبکه انکپسولاسیون می شود [۸، ۱۴].

### بررسی زنده مانی میکروکپسول های پروبیوتیکی در محیط شبیه سازی شده گوارش

هدف از انجام آزمایشات این بخش، بررسی اثر شبکه انکپسولاسیون بر قابلیت تحمل باکتری پروبیوتیک در شرایط شبیه سازی شده معده (در حضور آنزیم پپسین با pH ۱/۸) و روده کوچک (در حضور آنزیم پانکراتین با pH ۶/۸ و نمک های صفراوی (بایل اگزالات)) می باشد. همانطور که مشهود است فرآیند کو-میکروانکپسولاسیون باعث شد درصد زنده

جدول ۲- درصد زنده مانی نمونه بهینه (کو-میکروکپسول های حاوی آلژینات - پکتین - باکتری) و نمونه های کنترل (باکتری غیر انکپسوله/سلول آزاد) و (میکروکپسول های آلژینات - باکتری) در برابر محیط شبیه سازی شده ی گوارش در طی فواصل زمانی مختلف.

زنده مانی نمونه کنترل پس از ۵ ساعت قرار گیری در برابر شرایط شبیه سازی شده گوارش : ابتدا محیط معده (۲ ساعت) و سپس روده کوچک (۳ ساعت) بر اساس CFU/gr						نمونه کنترل (میکروکپسول های حاوی باکتری - آلژینات)
ساعت ۰	ساعت ۱	ساعت ۲	ساعت ۳	ساعت ۴	ساعت ۵	
۹۷/۳۵ ± ۰/۰۲	۸۷/۷۳ ± ۰/۱۵	۸۳/۲۵ ± ۰/۱۴	۸۲/۶۹ ± ۰/۰۲	۷۸/۲۰ ± ۰/۲۸	۷۴/۸۳ ± ۰/۳۵	
زنده مانی نمونه بهینه پس از ۵ ساعت قرار گیری در برابر شرایط شبیه سازی شده گوارش : ابتدا محیط معده (۲ ساعت) و سپس روده کوچک (۳ ساعت) بر اساس CFU/gr						نمونه بهینه (کو-میکروکپسول های حاوی باکتری - آلژینات - پکتین)
ساعت ۰	ساعت ۱	ساعت ۲	ساعت ۳	ساعت ۴	ساعت ۵	
۹۷/۳۵ ± ۰/۰۲	۹۱/۵ ± ۰/۳۵	۸۷/۷۳ ± ۰/۲۸	۸۴/۹۰ ± ۰/۲۸	۸۴/۰۵ ± ۰/۱۵	۸۳/۴۹ ± ۰/۰۲	
زنده مانی نمونه کنترل پس از ۵ ساعت قرار گیری در برابر شرایط شبیه سازی شده گوارش : ابتدا محیط معده (۲ ساعت) و سپس روده کوچک (۳ ساعت) بر اساس CFU/gr						نمونه کنترل (باکتری غیر انکپسوله / سلول آزاد)
ساعت ۰	ساعت ۱	ساعت ۲	ساعت ۳	ساعت ۴	ساعت ۵	
۹۷/۳۵ ± ۰/۰۲	۹۰/۶۵ ± ۰/۱۴	۸۰/۰۷ ± ۰/۰۲	۷۴/۸۳ ± ۰/۳۵	۶۸/۲۸ ± ۰/۳۵	۶۲/۵۲ ± ۰/۰۲	



شکل ۶- زنده مانی نمونه بهینه (کو-میکروکپسول های حاوی آلژینات - پکتین - باکتری) و نمونه های کنترل (باکتری غیر انکپسوله/سلول آزاد) و (میکروکپسول های آلژینات - باکتری) در برابر محیط شبیه سازی شده ی گوارش در طی فواصل زمانی مختلف.

کردند؛ انکپسولاسیون سوبیه های لاکتوباسیلوسی با آلژینات و پروتئین آب پنیر باعث حفظ بهتر پروبیوتیک ها در محیط شبیه سازی شده دستگاه گوارش می شود که با نتایج ما مطابقت داشت [۱۶]. در پژوهشی دیگر، تعداد باکتری لاکتوباسیلوس پلاتناروم میکروانکپسوله شده با آلژینات در زمان قرار گیری در محیط اسیدی معده از  $\log 8/9$  به  $\log 5/2$  رسید [۱۷]. در مطالعه ای که توسط سان و گریفیتس انجام شد، گونه های بیفیدوباکتریوم با استفاده از ترکیب صمغ زانتان-ژلان به عنوان پوشش انکپسوله شدند؛ نتایج نشان داد گرانول ها بسیار مقاوم به اسید بوده و در  $\text{pH} = 2/5$  کلونی های فعال پروبیوتیک انکپسوله شده فقط به میزان  $0/67$  لگاریتمی در طی ۳۰ دقیقه کاهش می یابد در حالی که سلول های آزاد از تعداد  $10^9 \text{ CFU/ml} \times 1/2$  به یک حد غیر قابل شمارش در همان فاصله ی زمانی رسیده است [۱۸].

براساس گزارش های فاوار و همکاران، انکپسوله کردن بیفیدوباکتریوم لاکتیس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس توسط سلولز استات فتالات باعث حفاظت بهتر این میکروارگانیزم در مقابل محلول های نمکی و اسیدی (مشابه با شرایط روده-ای) می شود [۱۹].

شایان ذکر است کو-میکروکپسول های طرح حاضر که متشکل از باکتری، آلژینات و پکتین است؛ دارای اندازه ای در محدوده  $1200$  الی  $1700$   $\mu\text{m}$  است که نسبت به

### بحث و نتیجه گیری

در تهیه غذاهای فراسودمند مبتنی بر باکتری پروبیوتیک، ضروری است که پروبیوتیک ها نه تنها در زمان فرآوری و نگهداری، بلکه در طول دستگاه گوارش نیز زنده مانی خود را حفظ کنند. میکروارگانیزم های مورد نظر باید در برابر شرایط تنش زا اعم از اسیدیته معده، آنزیم های گوارشی، پروتازها و نمک صفراوی در روده کوچک مقاوم باشند. فلور روده در انسان رابطه ی نزدیکی با سلامت دارد و اطمینان از رسیدن تعداد کافی پروبیوتیک به روده ی کوچک و روده ی بزرگ موجب تامین فلور روده و ایجاد اثرات سلامت بخش می شود. لذا در پژوهش حاضر به منظور افزایش زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس رامنسوس در شرایط شبیه سازی شده معده و روده انسان، این پروبیوتیک به وسیله سدیم آلژینات و پکتین کومیکروانکپسوله شد. مطابق داده های بدست آمده زنده مانی و تحمل شرایط تنش زا در باکتری های کو-میکروانکپسوله شده به مراتب بسیار بالاتر از بقیه بوده و از طرفی در بین میکروکپسول حاوی آلژینات و کو-میکروکپسول های حاوی آلژینات و پکتین، کو-میکروکپسول ها نسبت به شرایط نامساعد مذکور مقاوم تر بودند. این نتایج با داده های حاصل از پژوهش دیگران هم سو بود [۱۵]. گاباسی و همکاران در پژوهشی گزارش

لاکتوباسیلوس رامنسوس نقش بسیار مهمی در حفاظت از آن‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی اعم از محیط شبهه سازی معده و روده ایفا می‌کند. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی میکروکپسول‌ها نشان داد گرانول‌ها از پایداری مناسبی برخوردارند. هم چنین پروبیوتیک کو-میکروانکیسوله شده در مقایسه با سلول‌های باکتریایی آزاد و میکروکپسول‌ها در سامانه شبهه سازی شده دستگاه گوارش، مقاومت خوبی از خود نشان دادند. بنابراین یافته‌های حاصل گویای این امر می‌باشد که شبکه انکیسولاسیون باعث بهبود راندمان سویه های پروبیوتیکی و رهایش هدفمند آن‌ها در مکان و زمان مناسب (دستگاه گوارش) می‌شود.

میکروکپسول‌های حاوی باکتری و آلزینات بزرگتر محسوب می‌شود. بدین منظور در مطالعه ای مشاهده شد میکروکپسول‌های سنتز شده به روش اکستروژن دارای اندازه ای در محدوده ۱/۵ تا ۱/۹ میلی متر است که این اختلاف به دلیل نوع مواد بکار رفته، شرایط فرآیند و دستگاه‌های استفاده شده می‌باشد. هم چنین در پژوهش مورد نظر، سایز کو-میکروکپسول‌ها نسبت به میکروکپسول‌های افزایش داشت که در راستای پژوهش حاضر است [۸، ۲۰].

در جدول ۳، گزارش‌های علمی اخیر در مورد اثرات مواد انکیسوله کننده برای به دام انداختن سلول‌های پروبیوتیک جهت مقایسه با پژوهش حاضر گردآوری شده است. بطور کلی نتایج تحقیق حاضر، حاکی از آن است که استفاده از سدیم آلزینات و پکتین برای میکروانکیسوله کردن

جدول ۳- گزارش‌های علمی اخیر در مورد اثرات مواد انکیسوله کننده برای به دام انداختن سلول‌های پروبیوتیک

رفرنس	نتایج	متد انکیسولاسیون	سویه پروبیوتیکی	مواد انکیسوله کننده
[۲۱]	* بهبود ساختار متخلخل میکروکپسول‌ها ؛ * محافظت از سویه‌های میکروانکیسوله شده در طی نگهداری محیطی و هم چنین سامانه شبهه سازی شده دستگاه گوارش ؛	بستر سیال	لاکتوباسیلوس پاراکازنی	سدیم آلزینات - شلاک
[۲۲]	* افزایش راندمان انکیسولاسیون ؛ * بهبود پایداری باکتری‌های انکیسوله شده در طی نگهداری یخچالی ؛	اکستروژن	لاکتوباسیلوس کازنی	سدیم آلزینات - بذر کتان یا موسیلاژ بامیه سدیم آلزینات - بوتریوسفالوس
[۲۳]	* افزایش میزان بقای پروبیوتیک‌های انکیسوله شده در برابر شرایط شبهه سازی معده؛	بستر سیال	لاکتوباسیلوس پلانتاروم	سدیم آلزینات - سلولز
[۲۴]	* افزایش راندمان انکیسولاسیون ؛ * افزایش مقاومت باکتری‌های کو-میکروانکیسوله شده در برابر شرایط شبهه سازی شده گوارش نسبت به میکروکپسول‌های آلزینات ؛	اکستروژن	لاکتوباسیلوس پلانتاروم	سدیم آلزینات- آرابینوکیسیلان
[۲۵]	* افزایش مقاومت باکتری‌های میکروانکیسوله شده در برابر اسید معده و نمک صفراوی ؛	اکستروژن	بیفیدوباکتریوم انیمالیس	سدیم آلزینات - شیر گاو - اینولین
[۲۶]	* افزایش مقاومت باکتری‌های میکروانکیسوله شده در برابر اسید معده و نمک صفراوی ؛	اسپری درآینگ	ساکارومایسس سروریه	مالتودکسترین - سوکروز - سوربیتول
[۲۷]	* افزایش راندمان انکیسولاسیون ؛ * افزایش مقاومت باکتری‌های میکروانکیسوله شده در برابر شرایط شبهه سازی شده گوارش ؛	امولسیون	لاکتوباسیلوس اکازنی	سدیم آلزینات - موسیلاژ بذر کتان

[۲۸]	* افزایش مقاومت حرارتی میکروکپسول‌ها؛ * افزایش مقاومت باکتری‌های میکروانکپسوله شده در برابر شرایط شبیه سازی شده گوارش؛	امولسیون	بیفیدوباکتریوم لانگوم	سدیم آلزینات - کیتوسان
طرح حاضر	* افزایش راندمان انکپسولاسیون؛ * افزایش میزان بقای پروبیوتیک کو-میکروانکپسوله شده در برابر شرایط شبیه سازی شده معده و روده کوچک؛ * بهبود کارایی کومیکروکپسول‌ها نسبت به میکروکپسول‌ها؛	اکستروژن	لاکتوباسیلوس رامنوسوس	سدیم آلزینات - پکتین

### تضاد منافع

هیچگونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

### سپاس و قدردانی

نویسندگان مقاله حاضر مراتب قدردانی خود را از شرکت

دانش بنیان تک ژن زیست اعلام می کنند.

## منابع

1. Harandi, F.N., Khorasani, A.C., Shojaosadati, S.A., and Hashemi-Najafabadi, S.: 'Surface modification of electrospun wound dressing material by Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles incorporating Lactobacillus strains for enhanced antimicrobial and antibiofilm activity', *Surfaces and Interfaces*, 2022, 28, pp. 101592
2. Harandi, F.N., Khorasani, A.C., Shojaosadati, S.A., and Hashemi-Najafabadi, S.: 'Living Lactobacillus-ZnO nanoparticles hybrids as antimicrobial and antibiofilm coatings for wound dressing application', *Materials Science and Engineering: C*, 2021, 130, pp. 112457
3. Yoha, K.S., Nida, S., Dutta, S., Moses, J.A., and Anandharamkrishnan, C.: 'Targeted Delivery of Probiotics: Perspectives on Research and Commercialization', *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2022, 14, (1), pp. 15-48
4. Sarao, L.K., and Arora, M.: 'Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review', *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57, (2), pp. 344-371
5. Koh, W.Y., Lim, X.X., Tan, T.-C., Kobun, R., and Rasti, B.: 'Encapsulated Probiotics: Potential Techniques and Coating Materials for Non-Dairy Food Applications', *Applied Sciences*, 2022, 12, (19), pp. 10005
6. Lara-Espinoza, C., Carvajal-Millán, E., Balandrán-Quintana, R., López-Franco, Y., and Rascón-Chu, A.: 'Pectin and Pectin-Based Composite Materials: Beyond Food Texture', *Molecules*, 2018, 23, (4)
7. Martău, G.A., Mihai, M., and Vodnar, D.C.: 'The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector-Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability', *Polymers (Basel)*, 2019, 11, (11)
8. Vaziri, A.S., Alemzadeh, I., Vossoughi, M., and Khorasani, A.C.: 'Co-microencapsulation of Lactobacillus plantarum and DHA fatty acid in alginate-pectin-gelatin biocomposites', *Carbohydr Polym*, 2018, 199, pp. 266-275
9. Khorasani, A.C., and Shojaosadati, S.A.: 'Bacterial nanocellulose-pectin bionanocomposites as prebiotics against drying and gastrointestinal condition', *International journal of biological macromolecules*, 2016, 83, pp. 9-18
10. Khorasani, A.C., and Shojaosadati, S.A.: 'Pectin-non-starch nanofibers biocomposites as novel gastrointestinal-resistant prebiotics', *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 94, pp. 131-144
11. Yeung, T., Ücok, E.F., Tiani, K., McClements, D., and Sela, D.: 'Microencapsulation in Alginate and Chitosan Microgels to Enhance Viability of Bifidobacterium longum for Oral Delivery', *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7
12. Tu, L., He, Y., Yang, H., Wu, Z., and Yi, L.: 'Preparation and characterization of alginate-gelatin microencapsulated Bacillus subtilis SL-13 by emulsification/internal gelation', *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2015, 26, (12), pp. 735-749
13. Jaya, S., Durance, T., and Wang, R.: 'Effect of alginate-pectin composition on drug release characteristics of microcapsules', *Journal of Microencapsulation*, 2009, 26, (2), pp. 143-153
14. Eratte, D., McKnight, S., Gengenbach, T.R., Dowling, K., Barrow, C.J., and Adhikari, B.P.: 'Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates', *Journal of functional foods*, 2015, 19, pp. 882-892
15. Teunou, E., Vasseur, J., and Krawczyk, M.: 'Measurement and interpretation of bulk solids angle of repose for industrial process design', *Powder*

- handling and processing, 1995, 7, (3), pp. 219-228
16. Gbassi, G.K., Vandamme, T., Yolou, F.S., and Marchioni, E.: 'In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model', *International Dairy Journal*, 2011, 21, (2), pp. 97-102
  17. Brinques, G.B., and Ayub, M.A.Z.: 'Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt', *Journal of food engineering*, 2011, 103, (2), pp. 123-128
  18. Sun, W., and Griffiths, M.W.: 'Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads', *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 61, (1), pp. 17-25
  19. Fávares-Trindade, C.S., and Grosso, C.R.F.: 'Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile', *Journal of microencapsulation*, 2002, 19, (4), pp. 485-494
  20. Silva, M.P., Tulini, F.L., Martins, E., Penning, M., Fávares-Trindade, C.S., and Poncelet, D.: 'Comparison of extrusion and co-extrusion encapsulation techniques to protect *Lactobacillus acidophilus* LA3 in simulated gastrointestinal fluids', *LWT*, 2018, 89, pp. 392-399
  21. Silva, M.P., Tulini, F.L., Ribas, M.M., Penning, M., Fávares-Trindade, C.S., and Poncelet, D.: 'Microcapsules loaded with the probiotic *Lactobacillus paracasei* BGP-1 produced by co-extrusion technology using alginate/shellac as wall material: Characterization and evaluation of drying processes', *Food Research International*, 2016, 89, pp. 582-590
  22. Rodrigues, F.J., Omura, M.H., Cedran, M.F., Dekker, R.F., Barbosa-Dekker, A.M., and Garcia, S.: 'Effect of natural polymers on the survival of *Lactobacillus casei* encapsulated in alginate microspheres', *Journal of microencapsulation*, 2017, 34, (5), pp. 431-439
  23. Surono, I., Verhoeven, J., Verbruggen, S., and Venema, K.: 'Microencapsulation increases survival of the probiotic *Lactobacillus plantarum* IS-10506, but not *Enterococcus faecium* IS-27526 in a dynamic, computer-controlled in vitro model of the upper gastrointestinal tract', *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124, (6), pp. 1604-1609
  24. Wu, Y., and Zhang, G.: 'Synbiotic encapsulation of probiotic *Lactobacillus plantarum* by alginate-arabinoxylan composite microspheres', *Lwt*, 2018, 93, pp. 135-141
  25. Pradeep Prasanna, P., and Charalampopoulos, D.: 'Encapsulation in an alginate-goats' milk-inulin matrix improves survival of probiotic *Bifidobacterium* in simulated gastrointestinal conditions and goats' milk yoghurt', *International Journal of Dairy Technology*, 2019, 72, (1), pp. 132-141
  26. Suryabhan, P., Lohith, K., and Anu-Appaiah, K.: 'Sucrose and sorbitol supplementation on maltodextrin encapsulation enhance the potential probiotic yeast survival by spray drying', *Lwt*, 2019, 107, pp. 243-248
  27. Shafizadeh, A., Golestan, L., Ahmadi, M., Darjani, P., and Ghorbani-HasanSarai, A.: 'Encapsulation of *Lactobacillus casei* in alginate microcapsules: improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions using flaxseed mucilage', *Journal of food measurement and characterization*, 2020, 14, pp. 1901-1908
  28. Ji, R., Wu, J., and Zhang, J.: 'Extending viability of *Bifidobacterium longum* in chitosan-coated alginate microcapsules using emulsification and internal gelation encapsulation technology', *Frontiers in microbiology*, 2019, 10, pp. 454608

## The Effect of Co-microencapsulation of Alginate with Pectin on the Survivability of Probiotic Bacteria *Lactobacillus rhamnosus* under Simulated Gastrointestinal Tract Conditions and Investigation of Physicochemical Properties of the Produced Microcapsules

Maryam Tajabadi ebrahimi \*<sup>1</sup>, Fereshte Nazemi Harandi <sup>2</sup>, Tara Mirzaei <sup>1</sup>, zahra ziari <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Department of Biology, Faculty of Bio Sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Abstract:

Co-microencapsulation technique is a common method to increase the efficiency of probiotics during the process as well as their controlled and targeted release in the gastrointestinal tract. Thus, in the current research, to improve the viability of microorganisms in harsh gastrointestinal condition, the probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* was encapsulated in sodium alginate and pectin (as co-microencapsulating wall materials) using extrusion technique and then freeze-dried. Then the samples were placed in simulated conditions of stomach (pepsin enzyme, pH = 1.8) and small intestine (bile salt (bile oxalate) and pancreatin enzyme, pH = 6.8) for a total of 5 hours. Samples of optimal (co-microcapsule) and control (free cell and microcapsule) were characterized to investigation of physicochemical properties using FE-SEM, XRD and FT-IR assay. According to obtained results, the survival rate of free cells reduced to 62.52% after the passage through the gastrointestinal tract, while the viability of co-microcapsules and microcapsules reached 83.49% and 74.83%, respectively. Therefore, it is worth mentioning that the performance of co-microencapsulated probiotics was much higher than the acceptable level, due to the synergistic effect of the bioactive substances used. In summary, this study demonstrated that the co-microencapsulation network could be employed as a new system in the preservation of probiotics in the functional food industry.

**Key words:** probiotic, encapsulation, co-microcapsule, gastrointestinal tract.

---

\* ebrahimi\_mt@yahoo.com