



## ارزیابی زندگانی میکروکپسول‌های چند لایه سویه‌های پروبیوتیک لاكتوباسیلوس رامنوسوس و لاكتوباسیلوس پلاتاروم در شرایط شیوه‌سازی شده معده و روده

افسانه چهره آرا ضیابری<sup>۱</sup>، فاطمه تابنده<sup>۲</sup>، مریم اوقادی<sup>\*</sup><sup>۳</sup>، افشار علی‌حسینی<sup>۱</sup>، علی پرتوفی‌نیا<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه مهندسی شیمی و پلیمر، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، تهران، ایران  
<sup>۳</sup> گروه پالایش زیستی، دانشکده مهندسی فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۹

### چکیده

یکی از رویکردهای مهم در بحث کاربردهای غذایی و دارویی پروبیوتیک‌ها و اثربخشی آن‌ها در پیشگیری و درمان بیماری‌ها، طراحی سیستم‌های کارآمد برای انتقال درون‌تنی هدفمند می‌باشد. در این پژوهش، سیستم جدیدی برای انتقال درون‌تنی هدفمند پروبیوتیک‌ها معرفی شده است. اهداف این پژوهش شامل: کارآمدی میکروژل‌های آنتی‌اسید پوشش داده شده، با فرمولاسیون پلی‌الکتروولیت چند لایه آلتینات-کیتوزان با قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط شیوه‌سازی شده معده و روده می‌باشد. دو سویه از باکتری‌های پروبیوتیک شامل لاكتوباسیلوس رامنوسوس و لاكتوباسیلوس پلاتاروم به طور جداگانه در هیدروژل‌های آلتینات و کربنات کلسیم به عنوان یک عامل آنتی‌اسید (برای کنترل pH در شرایط اسیدی) ریزپوشانی شدند. سپس، توسط تکنیک خود موئناتر لایه‌به‌لایه LbL، با دو لایه آلتینات-کیتوزان پوشش داده شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که دو عامل آنتی‌اسید و ریزپوشانی<sup>۴</sup> لایه آلتینات-کیتوزان در حضور آنزیم پیپسین در pH=۱/۸ و آنزیم پانکراتین در pH=۶/۸، به طور قابل توجهی منجر به بهبود بقای باکتری‌های ریزپوشانی شده نسبت به باکتری‌های آزاد لاكتوباسیلوس پلاتاروم و لاكتوباسیلوس رامنوسوس، به ترتیب log(cfu/g) ۶ و ۲ می‌شوند. پس از عبور از سیستم شیوه‌سازی شده گوارشی، تعداد سلول‌های زنده باکتری‌ای در هر دو سویه پروبیوتیک، در حد قابل قبول (۱۰<sup>۰</sup> cfu/ml) تعیین شد. به طور کلی، این نتایج نشان می‌دهد، که میکروژل‌های محافظ گوارشی پوشش داده شده با فرمولاسیون پلی‌الکتروولیت چند لایه آلتینات-کیتوزان، می‌توانند در انتقال درون‌تنی کنترل شده پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل‌های غذایی به طور موفقیت‌آمیزی استفاده شوند.

**واژگان کلیدی:** آلتینات، پروبیوتیک، ریزپوشانی، میکروکپسول‌های چند لایه

\*m\_otadi@iauctb.ac.ir

## مقدمه

از مطالعات گزارش شده است که ریزپوشانی<sup>۵</sup> باکتری‌ها در هیدروژل‌های آلتینات<sup>۶</sup> از باکتری‌ها در شرایط دشوار گوارشی محافظت نمی‌کند. به طوریکه عوامل چیلاته کننده<sup>۷</sup> مانند سیترات‌ها، فسفات‌ها، لاتکتات‌ها (جادب‌های یون کلسیم) و کاتیون‌های آنتی‌ژل مانند  $Mg^{+2}$ ,  $Na^{+}$  ثبات مکانیکی ژل آلتینات را کاهش می‌دهند و در برخی از موارد می‌توانند سبب فروپاشی کامل ساختار ژله‌ای آلتینات شوند<sup>(۷)</sup>. همچنین، در مطالعه دیگری گزارش شده است که هیدرولیز اسیدی آلتینات در محیط‌های اسیدی سبب خشی شدن گروه هیدروکسیل و قطع پیوندهای عرضی بین هیدروکسیل آلتینات و کلسیم شده است. این امر به کاهش ثبات مکانیکی ژل آلتینات در محیط‌های اسیدی منجر می‌شود<sup>(۸)</sup>. در سایر مطالعات به این نکته اشاره شده است که پوشش‌های پلیمری با افزایش پایداری مکانیکی و شیمیایی، منجر به بهبود عملکرد میکروژل‌های آلتینات می‌شوند<sup>(۹)</sup>. بنابراین، بسیاری از منابع، پوشش‌دهی میکروبیدهای آلتینات را با یک پلیمر کاتیونی پیشنهاد دهاند<sup>(۶)</sup>. در سایر پژوهش‌ها، تأثیر مواد پوششی بر زنده‌مانی باکتری‌های پروپیوتیک میکروانکپسوله شده با انواع مختلف مواد پوششی، مانند کیتوزان، سدیم آلتینات، پروتئین آب پنیر و پلی‌الیزین، مطالعه شد. نتایج این پژوهش‌ها نشان داد کیتوزان به دلیل توانایی مقاومت و محافظت از سلول‌های زنده پروپیوتیک در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده، بهترین بازدهی را نشان می‌دهد<sup>(۱۰-۱۲)</sup>. علاوه بر آن، مطالعات روی کیتوزان و مخاط نشان داده است تشکیل واکنش‌های هیدروژنی و واکنش‌های الکتروستاتیک بین بار مثبت آمین‌های کیتوزان با بار منفی گلیکوپروتئین‌های مخاط نقش مهمی در مخاط چسبی کیتوزان دارد، که سبب چسبیدن ریزدانک‌ها به سلول‌های اپیتلیال مخاط می‌شود<sup>(۱۳) و (۱۴)</sup>. در مطالعه دیگری گزارش شده

بسیاری از مطالعات زیست‌شناسی و میکروبیولوژی بر اهمیت حیاتی حضور میکروبیوتای<sup>۱</sup> نرمال برای حفظ سلامت تأکید می‌کنند<sup>(۱)</sup>. نسبت مناسب بین فلور خوب یوبیوتیک<sup>۲</sup> و بد آنتروپاتوژنیک<sup>۳</sup> برای حفظ حالت بهزیستی ضروری است. هرگونه تغییر کمی و کیفی در این رابطه‌ی طریف، منجر به رشد بیش از حد باکتری‌های آنتروپاتوژنیک می‌شود که به این حالت دیسپیوز<sup>۴</sup> گفته می‌شود. دیسپیوز می‌تواند مجموعه‌ای از اثرات منفی را بر مخاط دستگاه گوارش آغاز کند. دیسپیوز در فعل نمودن پاسخ‌های التهابی نقش دارد. ظهور برخی از بیماری‌های پوستی، درماتیت<sup>۵</sup> آلوپسی<sup>۶</sup> و بیماری‌های عضلانی اسکلتی، آرتربیت<sup>۷</sup> بیماری‌های خودایمنی، بیماری تیروئید<sup>۸</sup>، پانکراتیت<sup>۹</sup> همچنین اختلالات خلقی، تحریک‌پذیری و افسردگی می‌تواند به طور غیر قابل باوری تظاهرات بالینی یک دیسپیوز پنهان روده‌ای باشند<sup>(۲) و (۳)</sup>.

راهبردهای متعددی برای تغییر ترکیب و ساختار میکروبیوتای روده توسعه یافته‌اند. یکی از این رویکردها تجویز خوارکی پروپیوتیک‌ها<sup>۱۰</sup> سین‌بیوتیک‌ها<sup>۱۱</sup> پست‌بیوتیک‌ها<sup>۱۲</sup> می‌باشد<sup>(۴)</sup>. اثرات مفید گونه‌های پروپیوتیک لاکتوپیاسیلوس پلاتارتاروم<sup>۱۳</sup> و لاکتوپیاسیلوس رامنوسوس<sup>۱۴</sup> بر سلامت انسان در آزمایش‌های بالینی بررسی شده است<sup>(۵)</sup>. از آلتینات کلسیم به علت غیرسمی بودن، زیست‌سازگاری، زیست‌تخربی‌پذیری و هزینه پایین، به طور گسترده برای محصور کردن باکتری‌های پروپیوتیک استفاده شده است<sup>(۶)</sup>. با این وجود، در برخی

<sup>۱</sup>microbiota<sup>۲</sup>Eubiotic<sup>۳</sup>Enteropathogenic<sup>۴</sup>Dysbiosis<sup>۵</sup>dermatitis<sup>۶</sup>alopecia<sup>۷</sup>musculoskeletal (arthritis)<sup>۸</sup>thyroiditis<sup>۹</sup>pancreatitis<sup>۱</sup> Probiotics

0

<sup>۱</sup> Symbiotics

1

<sup>۱</sup> Postbiotics

2

<sup>۱</sup> *Lactobacillus Plantarum*

3

<sup>۱</sup> *Lactobacillus Rhamnosus*

4

غذایی و دارویی به طور گستره‌ای استفاده می‌شود و نسبت به  $Mg(OH)_2$  در کنترل شرایط اسیدی معده عملکرد بهتری را نشان می‌دهد. بنابراین، در این پژوهش، ابتدا باکتری‌ها در هیدروژل‌های آنتی‌اسید بارگزاری شدند. برای ریزپوشانی هیدروژل‌های آنتی‌اسید از روش LbL رسوی استفاده شد. تکنیک LbL بر اساس جذب پی‌درپی ترکیبات با بار مخالف (پلی‌الکترولیت‌ها، نانوذرات و پروتئین‌ها) متمرکز است. این روش بر اساس رسوب متوالی پلی‌کاتیون‌ها و پلی‌آنیون‌ها است، که از طریق برهمکنش‌های الکتروستاتیک به هم متصل شده‌اند. در این پژوهش تعداد لایه‌ها در فرمولاسیون سه لایه آژینات-کیتوزان-آژینات (ACA)، افزایش یافت و با هدف بررسی نقش کیتوزان در حفاظت از باکتری‌ها در شرایط SGF و SIF، کیتوزان، در آخرین لایه قرار گرفت. سپس، هیدروژل‌های آنتی‌اسید، با استفاده از تکنیک LbL طراحی شد. اولین لایه آژینات یک پلیمر پلی‌آنیونی با گروه‌های کربوکسیل و دومین لایه، پلیمر پلی‌کاتیونی کیتوزان قرار داده شد. هدف از انجام این پژوهش ارزیابی دو عامل آنتی‌اسید (برای کنترل pH در شرایط اسیدی) و افزایش تعداد لایه‌ها در افزایش قابلیت زیستی و حفاظت از سلول در برابر شرایط سخت گوارشی است.

## مواد و روش‌ها

سدیم آژینات LB (با ویسکوزیته کم) از شرکت بیوشیمی Duchefa (Haarlem، هلند) تهیه شد. کیتوزان با وزن مولکولی پایین (448869 P سیگما آلدريچ)، نمک صفرا یا صفرای گاو (48305 P سیگما آلدريچ)، پسین، (7000 P سیگما آلدريچ) و پانکراتین، (3292 P سیگما آلدريچ) نیز از سیگما آلدريچ کانادا خریداری شدند. گلوکرمنو هیدرات ( $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ )، کلرید سدیم (NaCl)، کلسیم کلرید دی هیدرات (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O)

کیتوزان و آژینات دارای دانسیته بار بالایی هستند و با افزایش زمان اقامت در روده قادر به رهایش هدفمند پروبیوتیک‌ها در روده هستند. بنابراین، شرایط مناسبی برای رسانش هدفمند پروبیوتیک‌ها به روده فراهم می‌کنند (15 و 16). یکی از روش‌های پوشش‌دهی هیدروژل‌های کلسیم، روش لایه‌به‌لایه (LbL) است. تکنیک ساده‌ی LbL پژوهشگران را قادر می‌سازد بسیاری از سلول‌های زیستی را عامل‌دار کنند. توانایی طراحی پوسته با توجه به اندازه و نوع ترکیب به کار رفته در هر لایه، کنترل خواص کپسول‌ها مانند حساسیت به دما، pH، تراوایی و پایداری ساختاری را امکان‌پذیر کرده است. ترکیب به کار رفته در پوسته و ضخامت پوسته با توجه به شیمی سطح، نفوذپذیری انتخابی و انتشار، قابل طراحی است (17). بر اساس پژوهش‌های بالینی، مقالات متعددی اثربخشی فرمولاسیون LbL را در زمینه کاربردهای درمانی گزارش می‌دهند (25-۲۸). همچنین، از موارد دیگر پایداری ضعیف پروبیوتیک‌های محصور شده در هیدروژل‌های آژینات در شرایط معده و روده، می‌توان به ورود یون‌های هیدروژن ( $H^+$ ) به داخل شبکه هیدروژل و غیرفعال نمودن باکتری‌های کپسوله شده اشاره کرد.

برای افزایش پایداری پروبیوتیک‌ها در مسیر گوارشی، می‌توان از آنتی‌اسید‌ها استفاده کرد. آنتی‌اسید‌هایی مانند  $Mg(OH)_2$ ، یون‌های (OH)<sup>-</sup> آزاد می‌کنند. بنابراین، میکروژل‌های آژینات بارگذاری شده با یک عامل آنتی‌اسید  $Mg(OH)_2$  می‌توانند یون‌های هیدروژن را هنگام ورود به میکروژل‌ها، خنثی کنند و محیط اسیدی را تحمل کنند (26). از این‌رو، در این آزمایشات، برای افزایش قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط اسیدی معده و کنترل pH اسیدی معده، باکتری‌ها در هیدروژل‌های آنتی‌اسید (کربنات کلسیم) بارگزاری شدند. از  $CaCO_3$  به عنوان یک عامل آنتی‌اسید در گردید

<sup>1</sup>Layer by Layer deposition

<sup>2</sup>Polyelectrolytes

<sup>1</sup>LbL (Layer by Layer)

میکروانکپسولاسیون مطابق روش ایکبال<sup>۱</sup> و همکاران(۲۰۱۸) انجام شد. سوسپانسیون باکتری بر طبق روش ذکر شده در بخش قبل تهیه شد و در دمای ۴°C با دور ۴۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ min سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی دور ریخته شد. رسوب باکتری با سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ دو بار شست و شو داده شد. سپس ۵ ml محلول آثربنات سدیم ۱/۶٪ به رسوب باکتری اضافه شد. سپس، یک سرنگ استریل ۱۰ ml، با محلول، همگن شده سوسپانسیون باکتری و آثربنات سدیم پر شد و روی یک پمپ پیستونی با دبی ۲۹۵ mlit/hr و سرعت چرخش پیچ ۴۲/۵ rpm سوار شد. محلول همگن شده به صورت قطره های بسیار کوچک به ۱۰۰ ml محلول کلرید کلسیم (۰/۱M) که روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm در حال همزدن بود اکسترود شد. پس از ۵ min میکروکپسول های سفت شده، شکل گرفت. سپس، جهت شستشوی ریزدانک ها ۰/۶۶٪ از محلول رویی دور ریخته شد و به همان اندازه محلول استریل آب نمک ۰/۹٪ اضافه شد. این عمل سه بار تکرار شد. سپس، ۱۵ ml محلول کیتوزان ۰/۴٪ استریل به میکروکپسول ها اضافه شد و به آرامی برای ۳۰ min روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm همزده شد. اولین لایه روی هسته آثربنات سدیم تشکیل شد. میکروکپسول ها با روش قبل شسته شدند و در مرحله بعد ۱۵ ml محلول آثربنات سدیم ۰/۱٪ به میکروکپسول ها اضافه شد و برای ۲۰ min دیگر محلول به آرامی همزده شد. پس از شستشوی میکروکپسول ها، در پایان یک محلول کیتوزان استریل ۰/۰۱٪ به میکروکپسول ها اضافه شد و محلول به آرامی برای ۳۰ min دیگر همزده شد. میکروکپسول ها مجددا سه بار شسته شدند و کپسول نهایی ACAC چهار لایه آثربنات-کیتوزان تشکیل شد(۲۷).

### بررسی حل شدن ریزدانک ها در بافر فسفات و تری سدیم سیترات

آگار، پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)، تری سدیم سیترات دی هیدروژن دروت (NaOH)، هیدروکسید سدیم (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O)، اسید هیدروکلریک (HCl) نیز از شرکت مرک KGaA Darmstadt 64271 آلمان خریداری شد. دو گونه پروپیوتیک لاکتو باسیلوس رامنوسوس ATCC 7469 و لاکتو باسیلوس پلاتارتوم ATCC 14917 نیز تهیه شدند.

### روش ها تهیه استوک

در این پژوهش از سویه های لاکتو باسیلوس رامنوسوس و لاکتو باسیلوس پلاتارتوم به عنوان مدل پروپیوتیک استفاده شد. در ابتدا باکتری مورد نظر در محیط کشت<sup>۱</sup> MRS Agar، کشت ایزوله داده شد و در انکوباتور ثابت ۳۷°C به مدت ۴۸ h انکوبه شد. برای اطمینان از خلوص کشت ها، کلونی ها زیر میکروسکوپ مشاهده شدند. برای تهیه استوک، به کمک لوب از تک کلونی در محیط broth، کشت مایع تهیه شد. این کشت به مدت ۱۶ h در دمای ۳۷°C در انکوباتور ثابت قرار داده شد. سپس، با دور ۴۰۰ rpm و به مدت ۱۵ min سانتریفیوژ شد و به نسبت یک به یک محیط کشت و گلیسیرون ۲۰٪ به رسوب حاصله اضافه شد و استوک تهیه شده در فریزر در دمای ۸۰-۴°C نگهداری شد(۲۷). (۲۱).

### تهیه سوسپانسیون باکتری

ابتدا ۴۰ ml محیط کشت MRS broth در یک فالکون ۵۰ ml ریخته شد. از استوک یک پیش کشت تهیه شد و در انکوباتور ثابت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. پس از ۸ h OD به ۱ رسید. در این ۵٪ از پیش کشت، داخل کشت اصلی تلقیح شد و در انکوباتور ثابت در دمای ۳۷°C به مدت ۱۶ h انکوبه شد و فرایند ریزپوشانی در فاز سکون آغاز شد.

### فرآیند میکروانکپسولاسیون

<sup>۱</sup>Iqbal  
<sup>۲</sup>extrude

<sup>۳</sup>de Man, Rogosa and Sharpe medium (MRS)

به مدت ۲۰ min با دور ۱۵۰ rpm شیک شدند. ریزدانک‌ها به کمک صافی جدا شده و در آخرین مرحله، پس از شستشو ریزدانک‌ها در محلول کیتوزان٪ ۰/۰۱ به مدت ۳۰ min دقیقه غوطه‌ور شده و با دور ۱۵۰ rpm شیک شدند.(۲۶).

### بررسی قابلیت زیستی باکتری‌های ریزپوشانی شده ACAC به همراه آنتی‌اسید کربنات کلسیم در محلول شبیه‌سازی شده معده و روده

در ابتدا ریزدانک‌ها ۴ لایه ACAC به همراه آنتی‌اسید با روش ذکر شده در بالا تهیه شدند. برای بررسی قابلیت زیستی باکتری‌های ریزپوشانی شده ACAC با استفاده از روش تومارو-داچنسنو(۲۰۱۲)، ریزدانک‌ها به هر یک از فالکون‌های جداگانه استریل منتقل شد. به فالکون اول ۱۰ ml تری‌سدیم‌سیترات اضافه شد. پس از حل شدن کامل ریزدانک‌ها و تهیه رقت، از روش cfu برای تعیین جمعیت اولیه باکتری‌ها استفاده شد. به فالکون‌های بعدی به میزان ۱۰ ml از محلول شبیه‌سازی معده (SGF) شامل: ۲ g/L سدیم کلراید، ۳/۵ g/L گلوکز، ۳/۲ g/L پیپسین که pH آن توسط محلول HCl (۲M)، روی ۱/۸ تنظیم شده بود اضافه شد. این فالکون‌ها در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷°C و با دور ۷۵rpm قرار داده شدند، پس از گذشت ۶۰min، یکی از فالکون‌ها را خارج کرده و محلول رویی فالکون خالی شد و به آن ۱۰ml محلول تری‌سدیم‌سیترات اضافه شد و از روش cfu برای تعیین جمعیت باکتری‌ها استفاده شد. سپس، به ۳ فالکون باقی‌مانده که ۶۰ min در تماس با محلول شبیه‌سازی معده بودند، ۱۰ml محلول شبیه‌سازی روده (SIF) شامل: ۶/۸ g/L فسفات‌پتاسیم، ۱۰g/L پانکراتین، ۳/۵ g/L گلوکز که به کمک NaCl(۲M) که pH آن روی ۶/۸ تنظیم شده بود، اضافه شد و بار دیگر این فالکون‌ها در انکوباتور شیکردار قرار داده شدند و

ریزدانک‌ها مطابق روش ذکر شده در بخش قبل تهیه شدند. برای بررسی حل شدن ریزدانک‌های ۴ لایه ACAC، از دو محلول تری‌سدیم‌سیترات و محلول بافرفسفات استفاده شد. برای انجام آزمایش ریزدانک‌ها به ۴ قسمت با وزن ۱ g تقسیم شدند. سپس، ۱g یک گرم از ریزدانک‌ها به هر یک از فالکون‌های جداگانه استریل منتقل شد. به فالکون اول ۱۰ml محلول تری‌سدیم‌سیترات ۰/۱ M اضافه شد و به مدت ۲۰ min با دور ۲۰ rpm شیک شدند. فالکون دوم، به مدت ۲۵ min در ۱۰ ml محلول بافرفسفات با دور ۲۵۰ rpm شیک شد و فالکون سوم حاوی ۱ g از ریزدانک‌ها به مدت ۱۰ min در ۱۰ ml محلول تری‌سدیم‌سیترات و سپس ۱۰ min در ۱۰ ml بافرفسفات با دور ۲۵۰ rpm شیک شدند. آخرین فالکون به مدت ۱۰ min در ۱۰ ml بافرفسفات و سپس ۱۰ min در ۱۰ ml تری‌سدیم‌سیترات با دور ۲۵۰ rpm شیک شدند.

### تهیه ریزدانک‌ها ۴ لایه ACAC به همراه آنتی‌اسید کربنات کلسیم

در ابتدا سوسپانسیون باکتری با روش ذکر شده در بالا تهیه شد. سپس فالکون حاوی سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ شد و رسوب باکتری با سرم فیزیولوژی٪ ۰/۹ دو بار شست و شو داده شد. با استفاده از روش جی یو او همکاران(۲۰۱۹) در ابتدا به رسوب باکتری، ۲ ml محلول کلسیم‌کربنات ۰/۱ M و ۳ ml ۰/۱ M اضافه شد: سپس، محلول همگن شده با استفاده از یک پمپ سرنگی به ۱۰۰ ml ۰/۱ M محلول کلسیم کلراید ۱M دور ۲۰۰ rpm در حال همزدن بود، اکسترود شد. پس از گذشت ۱۵ min، ریزدانک‌ها به کمک صافی جدا شدند و در ۲۰ ml محلول کیتوزان٪ ۰/۴ به مدت ۳۰ min غوطه‌ور شده و با دور ۱۵۰ rpm شیک شدند. بار دیگر ریزدانک‌ها به کمک صافی جدا شده و بعد از شست و شو به ۲۰ ml محلول آلتینات٪ ۱/۱ منتقل شد. این ریزدانک‌ها

<sup>۱</sup>Tomaro-Duchesneau

<sup>۲</sup>GU

منحنی رشد باکتری لاکتوپاسیلوس رامنوسوس بر حسب زمان رسم شده و نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، باکتری در ۳ h اول در فاز تاخیری بوده و ساعت چهارم شروع به رشد نمایی کرده است و پس از گذشت ۱۶ h، باکتری لاکتوپاسیلوس رامنوسوس وارد فاز ثابت می‌شود. در فاز ثابت، شرایط باکتری ثبیت شده و باکتری در هنگام ورود به فاز ثابت دارای بالاترین مقاومت در برابر تنش‌های محیطی است و مناسب‌ترین زمان برای جداسازی باکتری‌ها از محیط کشت است (۲۸). بنابراین، زمان ۱۶ h تا ۱۸ h، به عنوان زمان مناسب برای جدا کردن توده‌سلولی از محیط کشت و انجام فرآیند میکروانکپسولاسیون به دست آمد. بر اساس مطالعات قبلی، منحنی رشد لاکتوپاسیلوس رامنوسوس در محیط کشت MRS در دمای گرمخانه گذاری  $37^{\circ}\text{C}$  تعیین شد. نتایج نشان داد باکتری لاکتوپاسیلوس رامنوسوس بعد از ۵ h وارد فاز نمایی می‌اند و پس از ۱۱ h وارد فاز ثابت تاخیری شده و بعد از گذشت ۱۵/۵ h وارد فاز ثابت می‌شود (۲۹). در مطالعه دیگری منحنی رشد لاکتوپاسیلوس رامنوسوس در محیط کشت MRS در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  در فازهای مختلف رشد تعیین شد. در این مطالعه باکتری پس از ۱۶ h وارد فاز ثابت رشد می‌شود (۳۰). نتایج این پژوهش با نتایج قبلی مطابقت دارد.

پس از گذشت زمان‌های ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ min محلول رویی را خالی کرده و به آن ۱۰ ml تری‌سدیم‌سیترات اضافه شد و با تهیه رقت، CFU تعیین شد. تمامی محلول‌های مورد استفاده اتوکلاو شدند به جز محلول شیوه‌سازی معده و رووده که فیلتر شدند (۲۱).

### بررسی مورفولوژی میکروکپسول‌ها به کمک SEM میکروسکوپ الکترونی روبشی

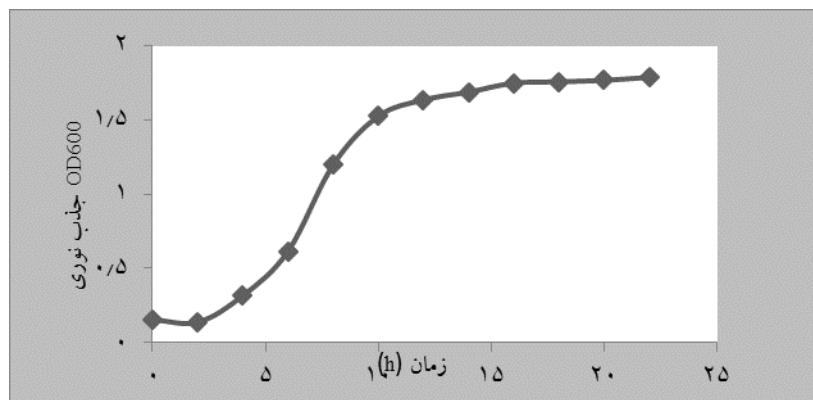
میکروکپسول‌ها ۴ لایه آلتربینات-کیتوزان، ابتدا به روش خشک کردن تصلیبی خشک شدند. سپس، برای بررسی مورفولوژی میکروکپسول‌های ۴ لایه، از میکروسکوپ الکترونی روبشی و تکنیک SEM استفاده شد. مشاهده میکروکپسول‌ها به وسیله میکروسکوپ الکترونی مدل (VEGA\TESCAN-XMU) در مرکز پژوهش متالوژی رازی انجام شد.

### تحلیل آماری داده‌ها

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ با سطح معنی‌داری آزمون‌ها ( $p \leq 0.05$ ) انجام شد و نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) ترسیم شده است.

### نتایج

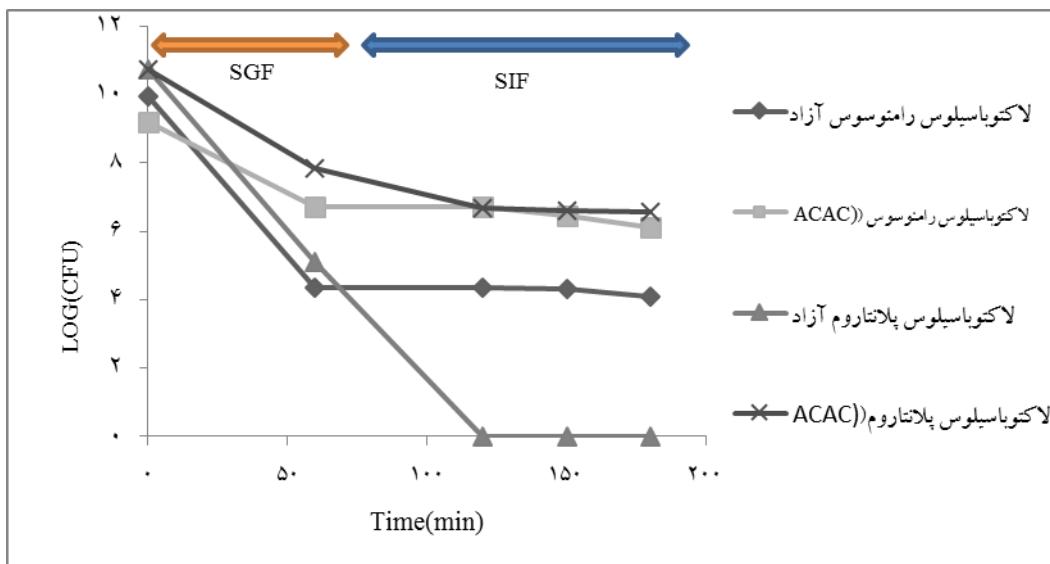
#### رسم منحنی رشد باکتری لاکتوپاسیلوس رامنوسوس بر حسب زمان



شکل ۱. منحنی رشد باکتری لاکتوپاسیلوس رامنوسوس بر حسب زمان.

جدول ۱. بررسی حل شدن ریزدانک‌ها ACAC در بافر فسفات و تری سدیم سیترات

حالت میکروکپسول‌های ACAC	بافر فسفات	تری سدیم سیترات ۰/۱ M	زمان (min)	وزن ریزدانک‌ها
ریزدانک‌ها حل نشدن	مرحله اول ۱۰ ml-۱۰ min	مرحله دوم ۱۰ ml-۱۰ min	۲۰ min-۲۵۰ rpm	۱ گرم
ریزدانک‌ها حل نشدن	-	-	۲۰ min-۲۵۰ rpm	۱ گرم
ریزدانک‌ها حل شدن	مرحله دوم ۱۰ ml-۱۰ min	مرحله اول ۱۰ ml-۱۰ min	۲۰ min-۲۵۰ rpm	۱ گرم
پس از ۲۰ min ریزدانک‌ها کاملاً حل شدن	-	۱۰ ml-۲۰ min	۲۰ min-۲۵۰ rpm	۱ گرم



شکل ۲. منحنی مقایسه زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس و باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلاتتاروم آزاد بر حسب Log(cfu/ml) و ریزپوشانی شده چهار لایه (ACAC) بر حسب Log(cfu/g) در زمان‌های مختلف شرایط شبیه‌سازی معده و روده

محلول‌های تری سدیم سیترات یا بافر فسفات برای انحلال ریزدانک‌ها استفاده می‌شود(۳۱ و ۳۲).

انحلال ریزدانک‌های ۴ لایه در محلول‌های تری سدیم سیترات و بافر فسفات بررسی شد. نتایج آزمایش نشان داد پس از ۲۰ min ریزدانک‌های غوطه‌ور شده در ۱۰ ml محلول تری سدیم سیترات، که با دور ۲۵۰ rpm در حال همزدن بود، کاملاً حل شدن. در جدول ۱ مراحل حل شدن ریزدانک‌ها در محلول تری سدیم سیترات و بافر فسفات مشخص شده است.

### بررسی حل شدن ریزدانک‌ها در بافر فسفات و تری سدیم سیترات

در ابتدا برای رهایش باکتری‌ها از داخل ریزدانک‌ها، انحلال آن‌ها بررسی شد. ساخت ریزدانک‌های چند لایه همراه با آنتی‌اسید برای اولین بار، انجام شد بنابراین، برای تعیین نوع حلال مناسب و زمان لازم تا تخریب کامل ریزدانک‌ها، آزمایشی مطابق جدول زیر طراحی شد. بر اساس رفنس‌های پیشین، از یکی از

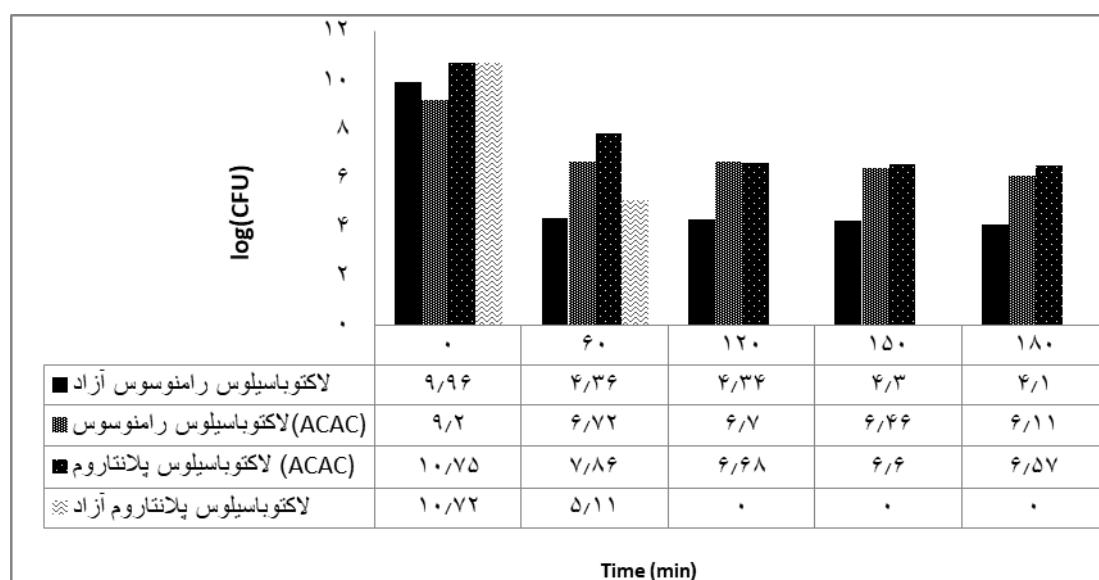
باکتری های لاکتوبراسیللوس پلاتنتروم نسبت به باکتری های آزاد و  $\log(\text{cfu/g})$  ۲ برای باکتری لاکتوبراسیللوس رامنوسوس نسبت به باکتری های آزاد، در شرایط دشوار گوارشی به همراه دارد و افزایش بقای باکتری های کپسوله شده، نسبت به باکتری های آزاد به طور معنی داری مشاهده شد.

مطابق با شکل ۳، نتایج به دست آمده از شمارش تعداد باکتری های زنده لاکتوبراسیللوس پلاتنتروم نشان می دهد قابلیت زیستی باکتری های آزاد لاکتوبراسیللوس پلاتنتروم در شرایط شبیه سازی شده روده به صفر می رسد. در حالی که پوشش دهی این باکتری ها در هیدروژل های آنتی اسید و پوشش دهی مجدد آنها در دو لایه آلژینات-کیتوزان، افزایش قابلیت زیستی باکتری های لاکتوبراسیللوس پلاتنتروم را تا ۶ سیکل لگاریتمی در مقایسه با سلول های آزاد تحت شرایط شبیه سازی شده گوارشی به همراه دارد. به نظر می رسد pH کربنات کلسیم به عنوان یک عامل آنتی اسید در کنترل pH اسیدی معده و افزایش قابلیت زیستی تا ۲ سیکل لگاریتمی در مقایسه با سلول های آزاد موثر بوده است و افزایش بقای باکتری های کپسوله شده، نسبت به باکتری های آزاد به طور معنی داری مشاهده شد.

بررسی قابلیت زیستی باکتری های ریزپوشانی شده ۴ لایه ACAC لاکتوبراسیللوس رامنوسوس و لاکتوبراسیللوس پلاتنتروم به همراه آنتی اسید کربنات کلسیم در محلول شبیه سازی شده معده و روده

هدف از انجام این بخش از آزمایشات بررسی اثر فرمولاسیون پلی الکترولیت چند لایه (ACAC) بر روی قابلیت زیستی باکتری های پروبیوتیک لاکتوبراسیللوس رامنوسوس و لاکتوبراسیللوس پلاتنتروم محصور شده در هیدروژل های آنتی اسید در شرایط شبیه سازی معده (در حضور پیسین،  $\text{pH}=1/8$ ) و شرایط شبیه سازی روده (در حضور پانکراتین،  $\text{pH}=6/8$ ) می باشد.

در شکل ۲، زنده مانی باکتری های آزاد و ACAC باکتری های ریزپوشانی شده ۴ لایه لاکتوبراسیللوس رامنوسوس و لاکتوبراسیللوس پلاتنتروم به همراه کربنات کلسیم در محلول شبیه سازی معده و روده در بازه های زمانی تعیین شده، با هم مقایسه شده است. همان طور که ملاحظه می شود، دو عامل ریزپوشانی چند لایه پلی الکترولیت و آنتی اسید،  $\log(\text{cfu/g})$  ۶ افزایش قابلیت زیستی را برای



شکل ۳. نمودار ستونی مقایسه زنده مانی باکتری لاکتوبراسیللوس رامنوسوس و باکتری های لاکتوبراسیللوس پلاتنتروم آزاد بر حسب  $\log(\text{cfu/ml})$  و ریزپوشانی شده چهار لایه (ACAC) بر حسب  $\log(\text{cfu/g})$

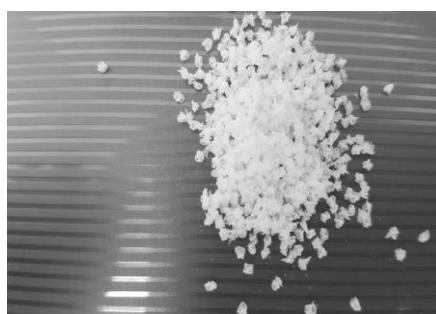
## بررسی مورفولوژی میکروکپسول‌ها در حالت مرطوب و خشک کردن انجام‌دادی

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد، میکروژلهای آلژینات کلسیم کروی شکل هستند (شکل ۴) و شکل آن‌ها با اضافه کردن کیتوزان تغییری نمی‌کند.

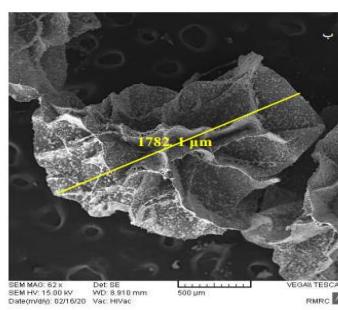
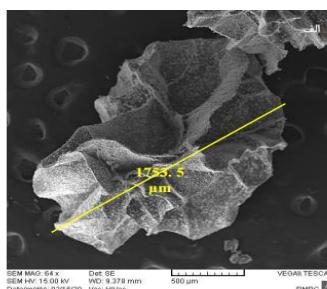
ریزپوشانی با فرمولاسیون ۴ لایه آلژینات-کیتوزان (ACAC) و عامل آنتی‌اسید توانته است تأثیر چشمگیری بر قابلیت زیستی باکتری‌ها در شرایط شبیه‌سازی معده و روده داشته باشد و تعداد سلول‌های قابل دوام در شرایط GI در سطح درمانی تجویز شده است.



شکل ۴. میکروبیدهای آلژینات کلسیم



شکل ۵- میکروکپسول‌های ۴ لایه آلژینات کیتوسان(ACAC) بعد از خشک کردن انجام‌دادی



شکل ۶- مورفولوژی میکروکپسول‌ها پس از خشک کردن انجام‌دادی با روش SEM

شرایط دشوار گوارشی را برای باکتری‌های لاکتوپاسیلوس پلاتتاروم قابل تحمل می‌کند. افزایش قابلیت زیستی باکتری‌های ریزپوشانی شده نسبت به باکتری‌های آزاد، نشان می‌دهد ریزپوشانی ۴ لایه روی انتقال مواد مغذی و دفع متابولیت‌ها<sup>۱</sup> وقفه ایجاد نکرده است و تعداد سلول‌های زنده و قابل دوام را برای هر دو سویه پروبیوتیک در شرایط GI<sup>۲</sup> در سطح درمانی تجویز شده، حفظ می‌کند. مورد دیگری که می‌توان به آن اشاره کرد این است که به نظر می‌رسد، تحمل غشاء چند لایه، در سویه‌های مختلف پروبیوتیک متفاوت است. نتایج آزمایشات نشان داد غشاء ۴ لایه (ACAC) از سوی باکتری لاکتوپاسیلوس پلاتتاروم نسبت به باکتری لاکتوپاسیلوس رامنوسوس بهتر تحمل شده است.

کامانی<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۱۱) ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک با سه لایه آژینات-کیتوزان-آژینات (ACA) را سبب افزایش مقاومت مکانیکی ریزدانک‌ها در برابر شرایط دشوار GI و رسانش هدفمند سلول‌های زنده به روده دانست(۱۹). کوک و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که ریزپوشانی میکروژل‌های آژینات با سه لایه (آژینات-کیتوزان)، قابلیت زیستی سلول‌ها را در شرایط گوارشی تا حداقل  $\log(\text{cfu})/\text{ml} + 0/17$  در ماتریس‌های پوشش داده شده سه لایه (آژینات-کیتوزان)، افزایش می‌دهد(۱۶). جیانگ<sup>۴</sup> و همکاران (۲۰۱۳) افزایش قابلیت زیستی باکتری‌های لاکتوپاسیلوس پلاتتاروم ریزپوشانی شده با فرمولاسیون آژینات-کیتوزان-آژینات (ACA)، را در شرایط SGF pH = ۲ و SIF pH = ۷/۲ به ترتیب بیش از ۶۵٪ و ۷۵٪ در محلول SGF و SIF به دست آمد(۳۴). در حالی که، پس از ۶۰ min هیچ یک از باکتری‌های آزاد در محلول شبیه‌سازی معده (SGF) در

ریزپوشانی چندلایه آژینات-کیتوزان تاثیری بر مورفولوژی ریزدانک‌های مرطوب ندارد، بنابراین، پیش از خشک کردن انجمادی، میکروکپسول‌های ۴ لایه کاملاً یکنواخت و کروی شکل هستند، که با سایر مطالعات در این زمینه مطابقت دارد(۳۳). به علاوه، در پژوهش دیگری گزارش شد که پوشش‌دهی انواع مواد روی مورفولوژی ریزدانک‌ها تأثیری ندارد(۱۰). در این پژوهش مورفولوژی میکروکپسول‌های ۴ لایه آژینات-کیتوزان (ACAC) پس از خشک کردن انجمادی با روش SEM تعیین شد. نتایج آزمون SEM نشان می‌دهد، میکروکپسول‌های ۴ لایه مورد بررسی دارای مورفولوژی گل شکل بوده و قطری حدود ۱/۸ mm دارند. شکل ۶ (الف) با بزرگنمایی ۶۲ برابر و شکل ۶ (ب) با بزرگنمایی ۶۴ برابر نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود، خشک کردن انجمادی منجر به تغییرات قابل مشاهده در مورفولوژی میکروکپسول‌ها شده است.

## بحث و نتیجه‌گیری

افزایش بقای باکتری‌های کپسوله شده (ACAC) نسبت به باکتری‌های آزاد به این شکل قابل توضیح است که میکروژل‌های آژینات بارگزاری شده با آنتی‌اسید (کربنات کلسیم) می‌توانند یون‌های هیدروژن را هنگام ورود به میکروژل‌ها، خنثی کنند. بنابراین، با حفظ pH خنثی داخلی، تحت شرایط اسیدی معده، زنده‌مانی این میکروژل‌های آنتی‌اسیدی، افزایش یافته است. علاوه بر آن، ریزپوشانی چند لایه آژینات-کیتوزان با افزایش مقاومت مکانیکی و شیمیایی، حفاظت بالاتر از سلول‌ها را فراهم می‌کند. ایجاد یک غشاء چند لایه متراکم به علت برهم‌کنش‌های یونی قوی بین آژینات (گروه آنیونی) و کیتوزان (گروه کاتونی) در این شرایط حفاظت موثر و بهبود ثبات میکروکپسول‌ها را به خوبی توضیح می‌دهد. این غشاء متراکم مانع از ورود نمک‌های صفراءوی به میکروکپسول‌ها شده و نقش بسیار مهمی در حفاظت از سلول‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی بازی می‌کند و

<sup>۱</sup>Metabolites

<sup>۲</sup>Gastrointestinal

<sup>۳</sup>Kanmani

<sup>۴</sup>Jiang

مولکولی پایین‌تر مشاهده شده است. هنگامی که بیشتر کربوکسیل های دارای بار منفی روی سطح هیدروژل‌های آژینات با بار مثبت گروه‌های آمینی موجود در ساختار کیتوسان محدود می‌شوند، ضخامت غشاء، حتی با افزایش غلظت کیتوسان افزایش پیدا نمی‌کند. همچنین، کیتوسان به عنوان یک ماده پوششی، پایداری کپسول‌های حاوی پروبیوتیک را در طول ذخیره سازی به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد<sup>(۱۵)</sup>. همانطور که در شکل ۵ ملاحظه می‌شود، خشک کردن انجمادی منجر به تغییرات قابل مشاهده در مورفو‌لوژی میکروبکپسول‌ها شده است. در شکل ۶ پس از خشک کردن انجمادی، ریزدانک‌ها چروکیده شده‌اند که با از دست دادن رطوبت ریزدانک‌ها، قابل توضیح است. همچنین، این ناهمواری سطحی می‌تواند به دلیل وجود سلول‌های باکتریایی در سطوح ریزدانک‌ها کم آب شده باشد که با یافته‌های یا و<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۱۶) به خوبی تطابق دارد<sup>(۳۶)</sup>. در این آزمایش از تکنیک اکستروژن، به عنوان متداول‌ترین تکنیک برای میکرانکپسولاسیون پروبیوتیک‌ها استفاده شد. پارامترهای متعددی مانند قطر نازل، غلظت پلیمر می‌توانند بر اندازه و عملکرد کپسوله‌سازی ریزدانک‌ها تولید شده توسط روش اکستروژن تأثیر بگذارند، همان‌طور که در مطالعات قبلی گزارش شده است اندازه ریزدانک‌ها عاملی بسیار مهم در پایداری و کارایی کپسوله‌سازی است. ریزدانک‌ها با اندازه بزرگ‌تر، حفاظت بیشتری نسبت به ریزدانک‌ها با اندازه کوچک‌تر فراهم می‌کنند. با این حال، برخی از نشریات اعلام کرده‌اند که ریزدانک‌ها با اندازه‌های کوچک‌تر برای جلوگیری از تاثیر حسی ناخوشایند در محصولات غذایی ترجیح داده می‌شوند<sup>(۳۷)</sup>. نتایج این پژوهش نشان داد که در صورت استفاده از اکسترودر با قطر نازل کوچک‌تر (تجهیزات پیشرفته‌تر)، ریزدانک‌هایی با اندازه بسیار کوچک‌تر به دست خواهد آمد. مطالعات نشان

حضور پسین زنده نماندند. در پژوهشی که Ramos<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۱۶) انجام دادند، سیستم جدیدی را برای انتقال درون‌تنی باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس (تلیدکننده فولیک اسید) طراحی کردند و باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس را با پوشش‌های چند لایه، آژینات-پلی‌ال‌لایزین-آژینات-کیتوزان ریزپوشانی نمودند و اثر مثبت این فرمولاژیون را در حفاظت از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس در برابر شرایط سخت گوارشی نشان دادند. در این پژوهش، تعداد سلول‌های زنده‌ی لاکتوکوکوس لاکتیس بعد از عبور از شرایط دشوار گوارشی در حد قابل قبول ( $10^6$  cfu/ml) بود، در حالی که، هیچ یک از باکتری‌های بدون پوشش لاکتوکوکوس لاکتیس پس از ۹۰ min قرار گرفتن در شرایط شبیه‌سازی معده، زنده نماندند. مطالعات متعدد نشان داده است که پوشش‌های کیتوزان بازده بالایی در حفاظت از سویه‌های مختلف پروبیوتیک در برابر شرایط دشوار گوارشی دارند و زنده‌مانی غلظت مناسبی از سلول‌های پروبیوتیک را تا رسیدن به روده حفظ می‌کنند<sup>(۳۸)</sup> و ۳۵، ۲۵، ۲۲، ۲۰، ۱۵، ۱۲). نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های حاصل از این مطالعات مطابقت دارد. همچنین، می‌توان از فناوری‌های مختلف و مواد هسته‌ای متفاوت، برای توسعه ریزپوشانی کردن پروبیوتیک‌ها با پوشش‌های کیتوزان و در نتیجه میکروبکپسول‌هایی با ویژگی‌های مختلف در اندازه ذرات، انواع کپسول و بازده حفاظتی استفاده کرد. مطالعات در این زمینه نشان می‌دهد، پایداری مکانیکی کپسول‌های پوشش داده شد با کیتوزان، به ضخامت لایه خارجی کیتوزان و به مقدار کیتوزان اتصال یافته به هیدروژل‌های آژینات بستگی دارد. بنابراین، فاکتورهایی که اتصال بین دو پلیمر آژینات و کیتوزان اتصال یافته به می‌دهند نیز می‌توانند پایداری کپسول‌ها را افزایش دهنند. همچنین، افزایش مقاومت مکانیکی بالاتری در کپسول‌های ساخته شده از کیتوزان با غلظت بیشتر و وزن

<sup>۱</sup>Ramos

*Lactococcus Lactis*

- Food Science and Food Safety. 2020.p:857-874
5. Larypoor M, Shams K, Hatami F. Evaluation of the effect of *Lactobacillus Plantarum* as a probiotic supplement on colorectal cancer affected by fatty foods. Applied Microbiology in Food Industry. 2022; 7(3): 64-75
  6. Amin T, Thakur M, Jain S. Microencapsulation-the Future of Probiotic Cultures. J Microbiol Biotechnol & Food Sciences. 2020; 10: 35-43.
  7. Simó G, Fernández-Fernández E, Vila-Crespo J, Ruípez V, Rodríguez-Nogales JM. Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation. Vol. 170, Carbohydrate Polymers. 2017. p. 1-14.
  8. Kamalian N, Mirhosseini H, Mustafa S, Manap MYA. Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 in simulated gastrointestinal fluid. Carbohydr Polym [Internet]. 2014;111:700-6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.014>
  9. Krasaekoop W, Bhandari B, Deeth HC. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. LWT - Food Sci Technol. 2006; 39(2): 177-83.
  10. Krasaekoop W, Bhandari B, Deeth H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. Int Dairy J. 2004;14(8):737-43.
  11. Ramos, P. E., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2018). Physiological protection of probiotic microcapsules by coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58: (11) 1864–1877
  12. Zou Q, Zhao J, Liu X, Tian F, Zhang H ping, Zhang H, et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. Int J Food Sci Technol. 2011;46(8):1672-8.
  13. Ramos PE, Abrunhosa L, Pinheiro A, Cerqueira MA, Motta C, Castanheira I, et al. Probiotic-loaded microcapsule system for human in situ folate production: Encapsulation and system validation. Food Res Int. 2016; 90:25-32
  14. Ramos, P. E., Cerqueira, M. A., Cook, M. T., Bourbon, A. I., Khutoryanskiy, V. V., Charalampoulos, D., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2016). Development of an immobilization system for in situ micronutrients release. *Food Research International*. 90: 121–132
  15. Calinoiu LF, řtefanescu BE, Pop ID, Muntean L, Vodnar DC. Chitosan coating applications in probiotic microencapsulation. Coatings. 2019;9(3): 1-2
  16. Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy V V. Production and evaluation

می دهد استفاده از آژینات با گلورونیک پایین، منجر به تشکیل دانه هایی با قطر کمتر می شود. برای دستیابی به میکروکپسول هایی با سایز کوچک تر می توان از تکنیک امولوسیون استفاده کرد. سایز میکروکپسول ها، در شدت کاهش می باید. سایز میکروپیدها در روش امولوسیون با طراحی راکتور، میکسر و سرعت همزن کنترل می شود. البته این تکنیک در مقایسه با روش اکستروژن گران قیمت تر می باشد زیرا در این روش، برای تهیه امولوسیون، مقدار زیادی روغن گیاهی مورد نیاز است. میکروکپسول های چند لایه آژینات- کیتوزان، قابلیت زیستی غلظت مناسبی از باکتری های پروبیوتیک را تا رسیدن به روده را حفظ می کنند. امید است تحقیقات بیشتر در زمینه فناوری LbL و طراحی میکروکپسول ها با انواع ترکیبات پلیمری و ضخامت های متفاوت، چشم انداز جدیدی در زمینه انتقال درون تی موفق مکمل های غذایی پروبیوتیک فراهم کند.

## تقدیر و تشکر

با تشکر از جناب آقای دکتر علی اکبری و خانم مهندس رحیمی کارشناسان محترم آزمایشگاه صنعت، پژوهشگاه ملی مهندسی ژئوتک و زیست فناوری، به دلیل همکاری شایسته ای که داشته اند. همچنین، از همکاری صمیمانه خانم مهندس پریسا خدادادی با مجری پژوهش تقدیر و تشکر می شود.

## منابع

1. Anselmo AC, McHugh KJ, Webster J, Langer R, Jaklenec A. Layer-by-Layer Encapsulation of Probiotics for Delivery to the Microbiome. *Adv Mater*. 2016; 28(43): 9486-90.
2. Dinan TG, Cryan JF. Brain-Gut-Microbiota Axis and Mental Health. *Psychosom Med*.2017;79(8):920-6.
3. Tomasello G, Sorice A, Damiani P, Sinagra E, Carini F. The importance of intestinal microbial flora (microbiota) and role of diet. *Prog Nutr*. 2017; 19(3):342-4.
4. Yao M, Xie J, Du H, McClements DJ, Xiao H, Li L. Progress in microencapsulation of probiotics:A review. *Comprehensive Reviews in*

- gastroprotective microgels: Improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocoll.* 2019;91:283–9.
27. Iqbal UH, Westfall S, Prakash S. Novel microencapsulated probiotic blend for use in metabolic syndrome: design and in-vivo analysis. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2018; <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1489270>
28. Zaghari L, Bassiri AR, Rahimi S, Zonusi A. Developing probiotic bread using *Lactobacillus reuteri* part 1: Evaluation of fluidized bed microencapsulation on viability of *Lactobacillus reuteri* in simulated gastrointestinal conditions. *Iranian Food Science and Technology.* 2018; 13(5), 844–857. doi: 10.22067/ifstrj.v13n5i0.56856.
29. Cicenia A, Santangelo F, Gambardella L, Pallotta L, Iebba V, Scirocco A, Marignani M, Tellan G, Carabotti M, Corazziari ES, Schippa S & Severi C. Protective Role of Postbiotic Mediators Secreted by *Lactobacillus rhamnosus GG* Versus Lipopolysaccharide-induced Damage in Human Colonic Smooth Muscle Cells. *Journal of Clinical Gastroenterology,* 50(December 2016), S140–S144.
30. Broeckx G, Kiekens S, Jokicevic K, Byl E, Henkens T, Vandeneheuvel D, Lebeer S &, Kiekens F. Effects of initial cell concentration, growth phase, and process parameters on the viability of *Lactobacillus rhamnosus GG* after spray drying. *Drying Technology.* 2020; 38(11), 1474–1492.
31. Mohammadi j, et al. Effect of Microencapsulation on survival of *Lactobacillus casei* in simulated gastrointestinal conditions and thermal treatment. *Innovative Food Technologies.* 2016; 4(13):31-43.DOI:
32. Yousefi H, Soleimanian-Zad S, Shahedi Bagh Khandan M. Microencapsulation of Probiotics by Emulsion Method for Production of Probiotic Bread. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology.* 2017; 11(4):99-106
33. Koo SM, et al. Improvement of the Stability of *Lactobacillus Casei* YIT 9018 by Microencapsulation Using Alginate and Chitosan. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2001; 11(3):376–83.
34. Jiang T, Kim YK, Singh B, Kang SK, Choi YJ, Cho CS. Effect of microencapsulation of *lactobacillus plantarum* 25 into alginate/chitosan/alginate microcapsules on viability and cytokine induction. *J Nanosci Nanotechnol.* 2013;13(8):5291–5.
35. Singh P, Medronho B, Alves L, da Silva GJ, Miguel MG, Lindman B. Development of carboxymethyl cellulose-chitosan hybrid micro- and macroparticles for encapsulation of probiotic bacteria. *Carbohydr Polym.* 2017;175:87–95.
- of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. *Biomacromolecules.* 2011;12(7):2834–40.
17. Fakhrullin RF, Lvov YM. “face-lifting” and “make-up” for microorganisms: Layer-by-layer polyelectrolyte nanocoating. *ACS Nano.* 2012. <https://doi.org/10.1021/nn301776y>
18. Chow KM, Liu ZC, Prakash S, Chang TMS. Free and Microencapsulated *Lactobacillus* and Effects of Metabolic Induction on Urea Removal. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2003;31(4):425–34.
19. Kamalian N, Mirhosseini H, Mustafa S, Manap MYA. Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 in simulated gastrointestinal fluid. *Carbohydr Polym.* 2014;
20. Kumar M, Nagpal R, Kumar R, Hemalatha R, Verma V, Kumar A, et al. Cholesterollowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. Vol. 2012, *Experimental Diabetes Research.* 2012.
21. Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Malhotra M, Coussa-Charley M, Kahouli I, Jones ML, et al. Probiotic ferulic acid esterase active *Lactobacillus fermentum* NCIMB 5221 APA microcapsules for oral delivery: Preparation and in vitro characterization. *Pharmaceuticals.* 2012;5(2):236–48.
22. Trabelsi I, Bejar W, Ayadi D, Chouayekh H, Kammoun R, Bejar S, et al. Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2013;61:36–42.
23. Urbanska AM, Paul A, Bhahena J, Prakash S. Suppression of Tumorigenesis: Modulation of Inflammatory Cytokines by Oral Administration of Microencapsulated Probiotic Yogurt Formulation. *Int J Inflam.* 2010;2010:1–10.
24. Yucel Falco C, Sotres J, Rascón A, Risbo J, Cárdenas M. Design of a potentially prebiotic and responsive encapsulation material for probiotic bacteria based on chitosan and sulfated β-glucan. *J Colloid Interface Science.* 2017;487:97–106.
25. Zaeim D, Sarabi-Jamab M, Ghorani B, Kadkhodaei R, Tromp RH. Electrospray assisted fabrication of hydrogel microcapsules by single- and double-stage procedures for encapsulation of probiotics. *Food Bioprod Process.* 2017;102:250–9.
26. Gu M, Zhang Z, Pan C, Goulette TR, Zhang R, Hendricks G, et al. Encapsulation of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G7 in

37. Shi LE, Li ZH, Li DT, Xu M, Chen HY, Zhang ZL, et al. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *J Food Eng* [Internet]. 2013;117(1):99–104.
36. M. Yao, J. Wu, B. Li, H. Xiao, D. J. McClements, and L. Li, “Microencapsulation of *Lactobacillus salivarius* Li01 for enhanced storage viability and targeted delivery to gut microbiota,” *Food Hydrocoll.*, vol. 72, pp. 228–236, 2017, doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.05.033.

## Evaluation of viability of multilayer microcapsules of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus Plantarum* under gastric and intestinal simulation conditions

Afsaneh Chehreara<sup>1</sup>, Fatemeh Tabandeh<sup>2</sup>, **Maryam Otadi\***<sup>1</sup>, Afshar Alihosseini<sup>1</sup>, Ali Partovinia<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering and Polymer, Tehran Central Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Departments of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), 1497716316, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Faculties of New Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

### Abstract

In order to targeted delivery of probiotics for food and drug applications and their effectiveness in preventing and treating various diseases, designing effective systems in this field can be helpful. In this paper, a new system for targeted delivery of probiotics has been introduced. The objectives of this study included: the efficiency of anti-acid microgels coated by multilayer polyelectrolyte formulation of alginate-chitosan for survivability of probiotic bacteria in gastric and intestinal simulation conditions. Two Strains of probiotic bacteria including *Lactobacillus Rhamnosus* and *Lactobacillus Plantarum* were encapsulated separately in alginate hydrogels and calcium carbonate as an antacid agent (to control pH under acidic conditions) and coated with double bilayer alginate-chitosan by LbL self-assembly technique. The results showed that (in the presence of pepsin enzyme and at pH=1.8 and in the presence of pancreatin enzyme and at pH=6.8), the survivability of these bacteria increased significantly compared to *Lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* 6 log(cfu/g) and 2.5 log(cfu/g) respectively. The number of viable cells in both probiotic strains was higher than the acceptable therapeutic level. In general, these results showed that these microcapsules can be used in controlled delivery of probiotics as food supplements successfully.

**Keywords:** Alginate, Probiotics, Microencapsulation, Multilayer Microencapsulation

\*m\_otadi@iauctb.ac.ir