



## ارزیابی زنده‌مانی میکروکپسول‌های چند لایه سویه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده

افسانه چهره‌آرا ضیابری<sup>۱</sup>، فاطمه تابنده<sup>۲</sup>، **مریم اوتادی**<sup>۱\*</sup>؛ افشار علی حسینی<sup>۱</sup>، علی پرتوی‌نیا<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،  
<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 پلی‌الکترولیت چند لایه آلژینات-کیتوزان با قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده می‌باشد. دو سویه از باکتری‌های پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم به‌طور جداگانه در هیدروژل‌های آلژینات و کربنات کلسیم به‌عنوان یک عامل آنتی‌اسید (برای کنترل pH در شرایط اسیدی) ریزپوشانی شدند. سپس، توسط تکنیک خود مونتاژ لایه‌به‌لایه LbL، با دو لایه آلژینات-کیتوزان پوشش داده شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که دو عامل آنتی‌اسید و ریزپوشانی ۴ لایه آلژینات-کیتوزان در حضور آنزیم پپسین در  $pH = 1/8$  و آنزیم پانکراتین در  $pH = 6/8$ ، به‌طور قابل توجهی منجر به بهبود بقای باکتری‌های ریزپوشانی شده نسبت به باکتری‌های آزاد لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس، به ترتیب  $6 \log(cfu/g)$  و  $2 \log(cfu/g)$  می‌شوند. پس از عبور از سیستم شبیه‌سازی شده گوارشی، تعداد سلول‌های زنده باکتریایی در هر دو سویه پروبیوتیک، در حد قابل قبول ( $10^6 cfu/ml$ ) تعیین شد. به‌طور کلی، این نتایج نشان می‌دهد، که میکروژل‌های محافظ گوارشی پوشش داده شده با فرمولاسیون پلی‌الکترولیت چند لایه آلژینات-کیتوزان، می‌توانند در انتقال درون‌تنی کنترل‌شده پروبیوتیک‌ها به‌عنوان مکمل‌های غذایی به‌طور موفقیت‌آمیزی استفاده شوند.

**واژگان کلیدی:** آلژینات، پروبیوتیک، ریزپوشانی، میکروکپسول‌های چندلایه

\*m\_otadi@iauctb.ac.ir

## مقدمه

از مطالعات گزارش شده است که ریزپوشانی<sup>۱۵</sup> باکتری‌ها در هیدروژل‌های آلژینات<sup>۱۶</sup> از باکتری‌ها در شرایط دشوار گوارشی محافظت نمی‌کند. به‌طوریکه عوامل چیلاته‌کننده<sup>۱۷</sup> مانند سیترات‌ها، فسفات‌ها، لاکتات‌ها (جاذب‌های یون کلسیم) و کاتیون‌های آنتی‌ژل مانند  $Mg^{+2}$ ،  $Na^{+}$  ثبات مکانیکی ژل آلژینات را کاهش می‌دهند و در برخی از موارد می‌توانند سبب فروپاشی کامل ساختار ژله‌ای آلژینات شوند<sup>(۷)</sup>. همچنین، در مطالعه دیگری گزارش شده است که هیدرولیز اسیدی آلژینات در محیط‌های اسیدی سبب ختنی شدن گروه هیدروکسیل و قطع پیوندهای عرضی بین هیدروکسیل آلژینات و کلسیم شده است. این امر به کاهش ثبات مکانیکی ژل آلژینات 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 آلژینات می‌شوند<sup>(۹)</sup>. بنابراین، بسیاری از منابع، پوشش‌دهی میکروبیدهای آلژینات را با یک پلیمر کاتیونی پیشنهاد داده‌اند<sup>(۶)</sup>. در سایر پژوهش‌ها، تأثیر مواد پوششی بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک میکروانکپسوله شده با انواع مختلف مواد پوششی، مانند کیتوزان، سدیم آلژینات، پروتئین آب پنیر و پلی‌الیزین، مطالعه شد. نتایج این پژوهش‌ها نشان داد کیتوزان به دلیل توانایی مقاومت و محافظت از سلول‌های زنده پروبیوتیک 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 ریزدانه‌ها به سلول‌های اپیتلیال مخاط می‌شود<sup>(۱۳ و ۱۴)</sup>. در مطالعه دیگری گزارش شد که

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 ظریف، منجر به رشد بیش از حد باکتری‌های آنتروپاتوژنیک می‌شود که به این حالت دیسبیوز<sup>۴</sup> گفته می‌شود. دیسبیوز می‌تواند مجموعه‌ای از اثرات منفی را بر مخاط دستگاه گوارش آغاز کند. دیسبیوز در فعال نمودن پاسخ‌های التهابی نقش دارد. ظهور برخی از بیماری‌های پوستی، درماتیت<sup>۵</sup> آلرژیک<sup>۶</sup> و بیماری‌های عضلانی‌اسکلنزی، آرتريت<sup>۷</sup> بیماری‌های خودایمنی، بیماری تیروئید<sup>۸</sup> پانکراتیت<sup>۹</sup> و همچنین اختلالات خلقی، تحریک‌پذیری و افسردگی می‌تواند به‌طور غیر قابل باوری تظاهرات بالینی یک دیسبیوز پنهان روده‌ای باشند<sup>(۲ و ۳)</sup>.

راهبردهای متعددی برای تغییر ترکیب و ساختار میکروبیوتای روده توسعه یافته‌اند. یکی از این رویکردها تجویز خوراکی پروبیوتیک‌ها<sup>۱</sup> سین‌بیوتیک‌ها<sup>۱</sup> و پست‌بیوتیک‌ها<sup>۱۱</sup> می‌باشد<sup>(۴)</sup>. اثرات مفید گونه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانٹاروم<sup>۱۳</sup> و لاکتوباسیلوس رامنوسوس<sup>۱۴</sup> بر سلامت انسان در آزمایش‌های بالینی بررسی شده است<sup>(۵)</sup>. از آلژینات کلسیم به علت غیرسمی بودن، زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و هزینه پایین، به‌طور گسترده برای محصور کردن باکتری‌های پروبیوتیک استفاده شده است<sup>(۶)</sup>. با این وجود، در برخی

<sup>1</sup> microbiota

<sup>2</sup> Eubiotic

<sup>3</sup> Enteropathogenic

<sup>4</sup> Dysbiosis

<sup>5</sup> dermatitis

<sup>6</sup> alopecia

<sup>7</sup> musculoskeletal (arthritis)

<sup>8</sup> thyroiditis

<sup>9</sup> pancreatitis

<sup>1</sup> Probiotics

<sup>1</sup> Symbiotics

<sup>1</sup> Postbiotics

<sup>1</sup> Lactobacillus Plantarum

<sup>1</sup> Lactobacillus Rhamnosus

<sup>1</sup> Microencapsulation

<sup>1</sup> Alginate

<sup>1</sup> chelating agents

غذایی و دارویی به‌طور گسترده‌ای 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 رسوبی<sup>۱</sup> 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 آلژینات-کیتوزان-آلژینات (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 آلژینات 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

### مواد

سدیم آلژینات LB (با ویسکوزیته کم) از شرکت بیوشیمی Duchefa (Haarlem، هلند) تهیه شد. کیتوزان با وزن مولکولی پایین (P 448869 سیگما آلدریج)، نمک صفرا یا صفرای گاو (P 48305 سیگما آلدریج)، پپسین، (P 7000 سیگما آلدریج) و پانکراتین، (P 3292 سیگما آلدریج) نیز از سیگما آلدریج کانادا خریداری شدند. گلوکزمنو هیدرات  $(C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O)$ ، کلرید سدیم (NaCl)، کلسیم کلرید دی هیدرات  $(CaCl_2 \cdot 2H_2O)$

کیتوزان و آلژینات 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 (۱۶ و ۱۵). یکی از روش‌های پوشش‌دهی هیدروژل‌های کلسیم، روش لایه‌به‌لایه (LbL) است. تکنیک ساده 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 (۱۷). بر اساس پژوهش‌های بالینی، مقالات متعددی اثربخشی فرمولاسیون LbL را در زمینه کاربردهای درمانی گزارش می‌دهند (۲۵-۱۸). همچنین، از موارد دیگر پایداری ضعیف پروبیوتیک‌های محصور شده در هیدروژل‌های آلژینات در شرایط معده و روده، می‌توان به ورود یون‌های هیدروژن  $(H^+)$  به داخل شبکه هیدروژل و غیرفعال نمودن باکتری‌های کپسوله‌شده اشاره کرد.

برای افزایش پایداری پروبیوتیک‌ها در مسیر گوارشی، می‌توان از آنتی‌اسیدها استفاده کرد. آنتی‌اسیدهایی مانند  $Mg(OH)_2$ ، یون‌های  $(OH^-)$  آزاد می‌کنند. بنابراین، میکروژل‌های آلژینات 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 (۲۶). 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  $CaCO_3$  به‌عنوان یک عامل آنتی‌اسید در گرید

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

<sup>2</sup>Polyelectrolytes

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

میکروانکپسولاسیون مطابق روش ایکبال<sup>۲</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 سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ، محلول رویی دور ریخته شد. رسوب باکتری با سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ دو بار شست و شو داده شد. سپس ۵ ml محلول آلژینات سدیم ۱/۶٪ به رسوب باکتری اضافه شد. سپس، یک سرنگ استریل ۱۰ ml، با محلول، همگن شده سوسپانسیون باکتری و آلژینات 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 قطره‌های بسیار کوچک به ۱۰۰ ml محلول کلرید کلسیم (۰/۱M) که روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm در حال همزدن بود اکستروود<sup>۳</sup> شد. پس از ۵ min میکروکپسول‌های سفت شده، شکل گرفت. سپس، جهت شستشوی ریزدانک‌ها 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 میکروکپسول‌ها اضافه شد و به آرامی برای ۳۰ min روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm همزده شد. اولین لایه روی هسته آلژینات سدیم تشکیل شد. میکروکپسول‌ها با روش قبل شسته شدند و در مرحله بعد ۱۵ ml محلول آلژینات سدیم ۰/۱٪ به میکروکپسول‌ها اضافه شد و برای ۲۰ min دیگر محلول به آرامی همزده شد. پس از شستشوی میکروکپسول‌ها، در پایان یک محلول کیتوزان استریل ۰/۱٪ به میکروکپسول‌ها اضافه شد و محلول به آرامی برای ۳۰ min دیگر همزده شد. میکروکپسول‌ها مجدداً سه بار شسته شدند و کپسول نهایی ACAC چهار لایه آلژینات-کیتوزان تشکیل شد (۲۷).

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

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

### روش‌ها تهیه استوک

در این پژوهش از سویه‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس پلانٹاروم به عنوان مدل پروبیوتیک استفاده شد. در ابتدا باکتری مورد نظر در محیط کشت MRS Agar<sup>۱</sup>، کشت ایزوله داده شد و در انکوباتور ثابت ۳۷°C به مدت ۴۸ h انکوبه شد. برای اطمینان از خلوص کشت‌ها، کلونی‌ها زیر میکروسکوپ مشاهده شدند. برای تهیه استوک، به کمک لوپ 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 ۴۰۰۰ rpm و به مدت ۱۵ min سانتریفوژ شد و به نسبت یک به یک محیط کشت و گلیسرول ۲۰٪ به رسوب حاصله اضافه شد و استوک تهیه شده در فریزر در دمای ۸۰°C- نگهداری شد (۲۷ و 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 OD، 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 ACAC

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

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

به مدت 20 min با دور rpm 150 شیک شدند. ریزدانک‌ها به کمک صافی جدا شده و در آخرین مرحله، پس از شستشو ریزدانک‌ها در محلول کیتوزان 0/1٪ به مدت 30 min دقیقه غوطه‌ور شده و با دور rpm 150 شیک شدند (26).

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

در ابتدا ریزدانک‌ها 4 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-داجنس (2012)، ریزدانک‌ها به 5 قسمت با وزن 1 g تقسیم شدند. 1 g از ریزدانک‌ها به هر یک از فالدکون‌های جداگانه استریل منتقل شد. به فالدکون اول 10 ml تری‌سدیم‌سیترات اضافه شد. پس از حل شدن کامل ریزدانک‌ها و تهیه رقت، از روش cfu برای تعیین جمعیت اولیه باکتری‌ها استفاده شد. به فالدکون‌های بعدی به میزان 10 ml از محلول شبیه‌سازی معده (SGF) شامل: 2 g/L سدیم کلراید، 3/5 g/L گلوکز، 3/2 g/L پپسین که pH آن توسط محلول (2M) HCl روی 1/8 تنظیم شده بود اضافه شد. این فالدکون‌ها در انکوباتور شیکردار با دمای 37°C و با دور rpm 75 قرار داده شدند، پس از گذشت 60 min، یکی از فالدکون‌ها را خارج کرده و محلول رویی فالدکون خالی شد و به آن 10 ml محلول تری‌سدیم‌سیترات اضافه شد و از روش cfu برای تعیین جمعیت باکتری‌ها استفاده شد. سپس، به 3 فالدکون باقی‌مانده که 60 min در تماس با محلول شبیه‌سازی معده بودند، 10 ml محلول شبیه‌سازی روده (SIF) شامل: 6/8 g/L فسفات پتاسیم، 10 g/L پانکراتین، 3/5 g/L گلوکز که به کمک (2M) NaCl که pH آن روی 6/8 تنظیم شده بود، اضافه شد و بار دیگر این فالدکون‌ها در انکوباتور شیکردار قرار داده شدند و

ریزدانک‌ها مطابق روش ذکر شده در بخش قبل تهیه شدند. برای بررسی حل شدن ریزدانک‌های 4 لایه ACAC، از دو محلول تری‌سدیم‌سیترات و محلول بافر فسفات استفاده شد. برای انجام آزمایش ریزدانک‌ها به 4 قسمت با وزن 1 g تقسیم شدند. سپس، 1 g یک گرم از ریزدانک‌ها به هر یک از فالدکون‌های جداگانه استریل منتقل شد. به فالدکون اول 10 ml محلول تری‌سدیم‌سیترات 0/1 M اضافه شد و به مدت 20 min با دور rpm 250 شیک شدند. فالدکون دوم، به مدت 20 min در 10 ml محلول بافر فسفات با دور rpm 250 شیک شد و فالدکون سوم حاوی 1 g از ریزدانک‌ها به مدت 10 min در 10 ml محلول تری‌سدیم‌سیترات و سپس 10 min در 10 ml بافر فسفات با دور rpm 250 شیک شدند. فالدکون چهارم، به مدت 10 min در 10 ml بافر فسفات و سپس 10 min در 10 ml تری‌سدیم‌سیترات با دور rpm 250 شیک شدند.

### تهیه ریزدانک‌ها 4 لایه ACAC به همراه آنتی‌اسید کربنات کلسیم

در ابتدا سوسپانسیون باکتری با روش ذکر شده در بالا تهیه شد. سپس فالدکون حاوی سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ شد و رسوب باکتری با سرم فیزیولوژی 0/9٪ دو بار شست و شو داده شد. با استفاده از روش جی یو و همکاران (2019) در ابتدا به رسوب باکتری، 2 ml محلول کلسیم کربنات 0/1 M و 3 ml محلول آلژینات 3٪ اضافه شد. سپس، محلول همگن شده با استفاده از یک پمپ سرنگی به 100 ml محلول کلسیم کلراید 0/1M که با دور rpm 200 در حال همزدن بود، اکستروود شد. پس از گذشت 15 min، ریزدانک‌ها به کمک صافی جدا شدند و در 20 ml محلول کیتوزان 0/4٪ به مدت 30 min غوطه‌ور شده و با دور rpm 150 شیک شدند. بار دیگر ریزدانک‌ها به کمک صافی جدا شده و بعد از شست‌وشو 20 ml محلول آلژینات 1٪ منتقل شد. این ریزدانک‌ها

<sup>1</sup>Tomaro-Duchesneau

<sup>1</sup>GU

پس از گذشت زمان‌های ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه 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 شبیه‌سازی معده و روده که فیلتر شدند (۲۱).

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

میکروکپسول‌ها ۴ لایه آلژینات-کیتوزان، ابتدا به روش خشک کردن تصعیدی 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.

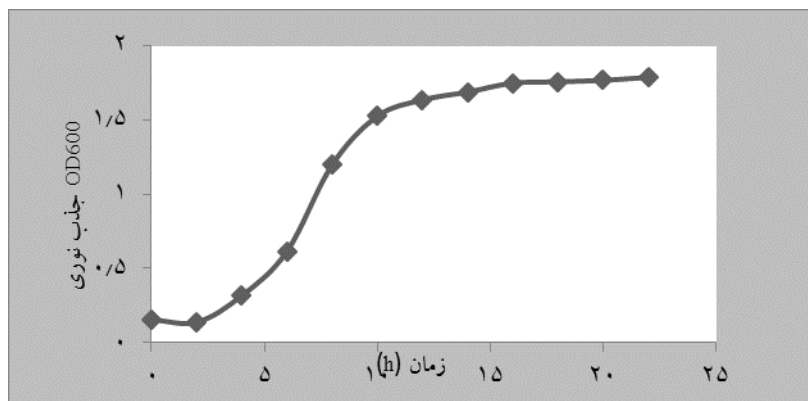
### تحلیل آماری داده‌ها

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 لاکتوباسیلوس رامنوسوس بر حسب زمان

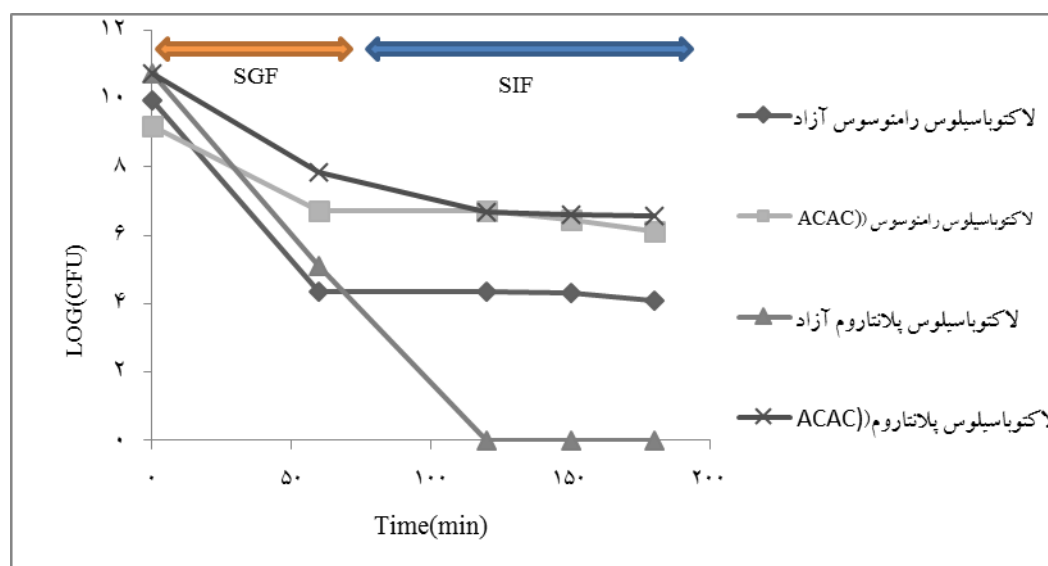
منحنی رشد باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس بر حسب زمان رسم شده و نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، باکتری در ۳ h اول در فاز تاخیری بوده و ساعت چهارم شروع به رشد نمایی کرده است و پس از گذشت ۱۶ h، باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس وارد فاز ثابت می‌شود. در فاز ثابت، شرایط باکتری تثبیت 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، به‌عنوان زمان مناسب برای جدا کردن توده سلولی از محیط کشت و انجام فرآیند میکروانکپسولاسیون به‌دست آمد. بر اساس مطالعات قبلی، منحنی رشد لاکتوباسیلوس رامنوسوس در محیط کشت MRS در دمای گرم‌خانه‌گذاری  $37^{\circ}\text{C}$  تعیین شد. نتایج نشان داد باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس بعد از ۵ h وارد فاز نمایی میانی و پس از ۱۱ h وارد فاز نمایی تاخیری شده و بعد از گذشت ۱۵/۵ h وارد فاز ثابت می‌شود (۲۹). در مطالعه دیگری منحنی رشد لاکتوباسیلوس 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.



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

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

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



شکل ۲. منحنی مقایسه زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس و باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم 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 (۲۱، ۳۱ و ۳۲).

انحلال ریزدانک‌های ۴ لایه در محلول‌های تری‌سدیم‌سیترات و بافر فسفات بررسی شد. نتایج آزمایش نشان داد پس از ۲۰ min ریزدانک‌های غوطه‌ور شده در ۱۰ ml محلول تری‌سدیم‌سیترات، که با دور ۲۵۰ rpm در حال همزدن بود، کاملاً حل شدند. در جدول ۱ مراحل حل‌شدن ریزدانک‌ها در محلول تری‌سدیم‌سیترات 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 رفرنس‌های پیشین، از یکی از

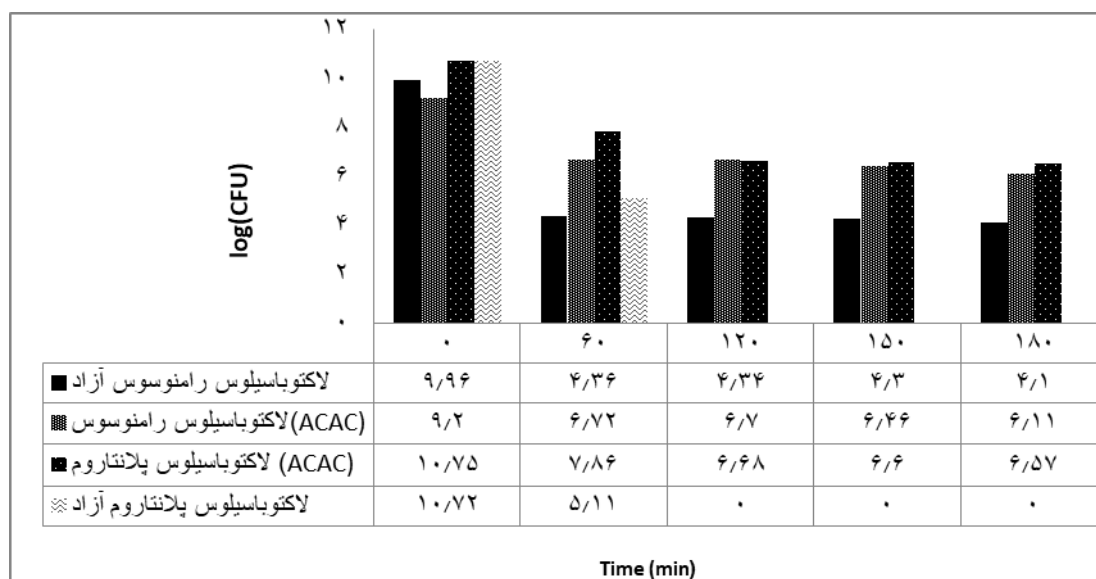
باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانتروم نسبت به باکتری‌های آزاد و  $2 \log(\text{cfu/g})$  برای باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس نسبت به باکتری‌های آزاد، در شرایط دشوار گوارشی به همراه دارد و افزایش بقای باکتری‌های کپسوله شده، نسبت به باکتری‌های آزاد به طور معنی داری مشاهده شد.

مطابق با شکل ۳، نتایج به دست آمده از شمارش تعداد باکتری‌های زنده لاکتوباسیلوس پلانتروم نشان می‌دهد قابلیت زیستی باکتری‌های آزاد لاکتوباسیلوس پلانتروم در شرایط شبیه‌سازی شده روده به صفر می‌رسد. در حالی که پوشش دهی این باکتری‌ها در هیدروژل‌های آنتی‌اسید و پوشش دهی مجدد آنها در دو لایه آلژینات-کیتوزان، افزایش قابلیت زیستی باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانتروم را تا ۶ سیکل لگاریتمی در مقایسه با سلول‌های آزاد تحت شرایط شبیه‌سازی شده گوارشی به همراه دارد. به نظر می‌رسد کربنات کلسیم به عنوان یک عامل آنتی‌اسید در کنترل pH اسیدی معده و افزایش قابلیت زیستی تا ۲ سیکل لگاریتمی در مقایسه با سلول‌های آزاد موثر بوده است و افزایش بقای باکتری‌های کپسوله شده، نسبت به باکتری‌های آزاد به طور معنی داری مشاهده شد.

### بررسی قابلیت زیستی باکتری‌های ریزپوشانی شده ۴ لایه ACAC لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس پلانتروم به همراه آنتی‌اسید کربنات کلسیم در محلول شبیه سازی شده معده و روده

هدف از انجام این بخش از آزمایشات بررسی اثر فرمولاسیون پلی‌الکترولیت چند لایه (ACAC) بر روی قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس پلانتروم محصور شده در هیدروژل‌های آنتی‌اسید در شرایط شبیه‌سازی معده (در حضور پپسین،  $\text{pH}=1/8$ ) و شرایط شبیه‌سازی روده (در حضور پانکراتین،  $\text{pH}=6/8$ ) می‌باشد.

در شکل ۲، زنده‌مانی باکتری‌های آزاد و باکتری‌های ریزپوشانی شده ۴ لایه ACAC لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس پلانتروم به همراه کلسیم کربنات  $0/1 \text{ M}$  (به عنوان آنتی‌اسید) در محلول شبیه‌سازی معده و روده در بازه‌های زمانی تعیین شده، با هم مقایسه شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، دو عامل ریزپوشانی چند لایه پلی‌الکترولیت و آنتی‌اسید،  $6 \log(\text{cfu/g})$  افزایش قابلیت زیستی را برای



شکل ۳. نمودار ستونی مقایسه زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس و باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانتروم آزاد بر حسب  $\log(\text{cfu/ml})$  و ریزپوشانی شده چهار لایه (ACAC) بر حسب  $\log(\text{cfu/g})$

### بررسی مورفولوژی میکروکپسول‌ها در حالت

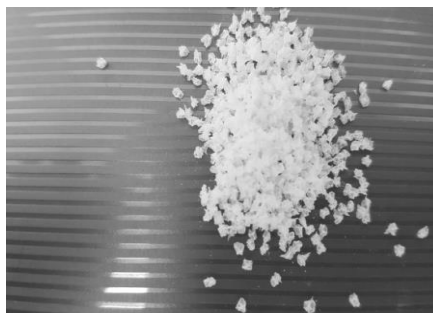
### مرطوب و خشک کردن انجمادی

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

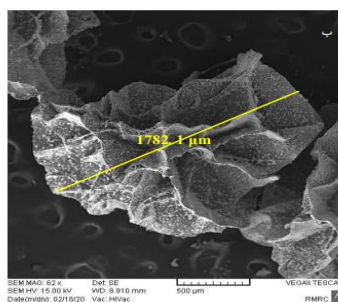
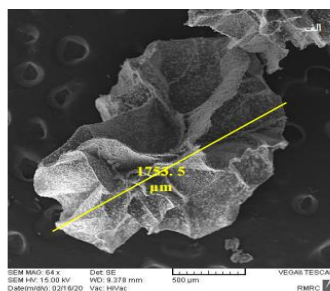
ریزپوشانی با فرمولاسیون ۴ لایه آلژینات-کیتوزان (ACAC) و عامل آنتی‌اسید توانسته است تأثیر چشمگیری بر قابلیت زیستی باکتری‌ها در شرایط شبیه‌سازی معده و روده داشته باشد و تعداد سلول‌های قابل دوام در شرایط GI در سطح درمانی تجویز شده است.



شکل ۴. میکروبیدهای آلژینات کلسیم



شکل ۵- میکروکپسول‌های ۴ لایه آلژینات کیتوزان (ACAC) بعد از خشک کردن انجمادی



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

شرایط دشوار گوارشی را برای باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلاتناروم 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 لاکتوباسیلوس پلاتناروم نسبت به باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس بهتر تحمل شده است.

کامانی<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۱۱) ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک با سه لایه آلژینات - کیتوزان - آلژینات (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 آلژینات با سه لایه (آلژینات - کیتوزان)، قابلیت زیستی سلول‌ها را در شرایط گوارشی تا حداکثر  $\log(\text{cfu/ml}) = 0.17 +$  در ماتریس‌های پوشش داده شده سه لایه (آلژینات - کیتوزان)، افزایش می‌دهد (۱۶). جیانگ<sup>۴</sup> و همکاران (۲۰۱۳) افزایش قابلیت زیستی باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلاتناروم ریزپوشانی شده با فرمولاسیون آلژینات - کیتوزان - آلژینات (ACA)، را در شرایط SGF (pH = ۲) و SIF (pH = ۷/۲) گزارش می‌دهند، زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی شده ۳ لایه (ACA) بعد از ۱۲۰ min در محلول SGF و SIF به ترتیب بیش از ۶۵٪ و ۷۵٪ به دست آمد (۳۴). در حالی که، پس از ۶۰ min، هیچ یک از باکتری‌های آزاد در محلول شبیه‌سازی معده (SGF) در

ریزپوشانی چندلایه آلژینات - کیتوزان تأثیری 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 آلژینات - 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 کپسوله‌شده (ACAC) نسبت به باکتری‌های آزاد به این شکل قابل توضیح است که میکروژل‌های آلژینات 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 چندلایه آلژینات - 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 آلژینات (گروه آنیونی) و کیتوزان (گروه کاتیونی) در این شرایط حفاظت موثر و بهبود ثبات میکروکپسول‌ها را به خوبی توضیح می‌دهد. این غشاء متراکم مانع از ورود نمک‌های صفراوی 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 کربوکسیل‌های دارای بار منفی روی سطح هیدروژل‌های آلژینات با بار مثبت گروه‌های آمینی موجود در ساختار کیتوسان محدود می‌شوند، ضخامت غشاء، حتی با افزایش غلظت کیتوسان افزایش پیدا نمی‌کند. همچنین، کیتوسان به‌عنوان یک ماده پوششی، پایداری کپسول‌های حاوی پروبیوتیک را در طول ذخیره‌سازی به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد (۱۵). همانطور که در شکل ۵ ملاحظه می‌شود، خشک کردن انجمادی منجر به تغییرات قابل مشاهده در مورفولوژی میکروکپسول‌ها 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 ناهموازی سطحی می‌تواند به دلیل وجود سلول‌های باکتریایی در سطوح ریزدانک‌های کم آب شده باشد که با یافته‌های یاو<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۱۶) به خوبی تطابق دارد (۳۶). در این آزمایش از تکنیک اکستروژن، به‌عنوان متداول‌ترین تکنیک برای میکروانکپسولاسیون پروبیوتیک‌ها استفاده شد. پارامترهای متعددی مانند قطر نازل، غلظت پلیمر می‌توانند بر اندازه و عملکرد کپسوله‌سازی ریزدانک‌های 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 تأثیر حسی ناخوشایند در محصولات غذایی ترجیح داده می‌شوند (۳۷). نتایج این پژوهش نشان داد که در صورت استفاده از اکستروژر با قطر نازل کوچک‌تر (تجهیزات پیشرفته‌تر)، ریزدانک‌هایی با اندازه بسیار کوچک‌تر به‌دست خواهد آمد. مطالعات نشان

حضور پپسین زنده نماندند. در پژوهشی که راموس<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۱۶) انجام دادند، سیستم جدیدی را برای انتقال درون‌تنی باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس (تولیدکننده فولیک اسید) طراحی کردند و باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس را با پوشش‌های چند لایه، آلژینات-پلی‌ال‌لایزین-آلژینات-کیتوزان ریزپوشانی نمودند و اثر مثبت این فرمولاسیون را در حفاظت از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس در برابر شرایط سخت گوارشی نشان دادند. در این پژوهش، تعداد سلول‌های زنده لاکتوکوکوس لاکتیس بعد از عبور از شرایط دشوار گوارشی در حد قابل قبول ( $10^6$  cfu/ml) بود، درحالی‌که، 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 (۲۵، ۲۲، 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 میکروکپسول‌هایی 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 آلژینات بستگی دارد. بنابراین، فاکتورهایی که اتصال بین دو پلیمر آلژینات و کیتوزان را افزایش می‌دهند نیز می‌توانند پایداری کپسول‌ها را افزایش دهند. همچنین، افزایش مقاومت مکانیکی بالاتری در کپسول‌های ساخته شده از کیتوزان با غلظت بیشتر و وزن

<sup>۱</sup>Ramos<sup>۲</sup>*Lactococcus Lactis*<sup>۳</sup>Yao

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, Ruipérez 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. Krasaekoopt 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. Krasaekoopt 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, Ștefanescu 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 آلژینات با گلوکونیک پایین، منجر به تشکیل دانه هایی با قطر کمتر می شود. برای دستیابی به میکروکپسول هایی با سایز کوچک تر می توان از تکنیک امولسیون استفاده کرد. سایز میکروکپسول ها، در تکنیک امولسیون در مقایسه با تکنیک اکستروژن به شدت کاهش می یابد. سایز میکروبیدها در روش امولسیون 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 امولسیون، مقدار زیادی روغن گیاهی مورد نیاز است. میکروکپسول های چند لایه آلژینات-کتوزان، 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 تنی 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 ژنتیک 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, Sorce 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.v1395i0.56856.
29. Cicienia 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, Vandenneuvel 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, Soleimani-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. Cholesterol-lowering 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  $\beta$ -glucan. *J Colloid Interface Science.* 2017;487:97–106.
25. Zaeim D, Sarabi-Jamab M, Ghorani B, Kadkhodae 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