

مروری بر انواع روش‌های میکروریزپوشانی و نانو پوشش‌دهی باکتری‌های پروبیوتیک

صفیه رجب‌زاده شان‌دیز، مرضیه حسینی نژاد*

پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، گروه زیست‌فناوری، مشهد، ایران

m.hosseininezhad@rifst.ac.ir

چکیده

فرآوری پروبیوتیک‌ها با سدهای حفاظتی، روش موثری جهت حفظ آن‌ها تا رسیدن به روده و استقرارشان است. در این میان ریزپوشانی به‌عنوان تکنیکی برای قراردادن پروبیوتیک‌ها در کپسول‌های کوچک به‌منظور افزایش کارایی آن‌ها در حین فرآیند و همچنین رهایش کنترل‌شده در دستگاه گوارش مورد استفاده قرار می‌گیرد. ریزپوشانی، پوشینه‌های بزرگ‌تر از ۳ میلی‌متر را شامل نمی‌شود. این تکنیک در محدوده ۱ تا ۱۰۰۰ میکرون میکروریزپوشانی و اگر با پلیمری از ترکیبات با ابعاد ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر صورت پذیرد، نانوپوشینه عنوان می‌گردد. در این مقاله، به مروری بر مهم‌ترین روش‌های میکروریزپوشانی و نانوپوشش‌دهی پروبیوتیک‌ها به همراه مواد، روش‌ها، مزایا و معایب آن‌ها در صنعت غذا پرداخته شده است.

کلمات کلیدی: باکتری‌های پروبیوتیک، تکنیک ریزپوشانی، میکروریزپوشینه، نانوپوشینه

مقدمه

پروبیوتیک‌ها ارگانیسم‌ها یا مواد حاملی هستند که تعادل میکروبی روده را بهبود می‌بخشند و معروف‌ترین آن‌ها شامل گونه‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم هستند (۱). اگرچه سوش‌های دیگری چون *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سرئوس* در کنار برخی مخمرها، به‌ویژه *ساکارومایسس سرویزیه* نیز چنین اثرات سودمندی دارند (۲). به‌منظور ایجاد اثرات سودمند، طی مصرف فرآورده‌های پروبیوتیک، لازم است که این باکتری‌ها زنده مانده و در مکان مناسب

(سطوح مخاطی روده) مستقر و تکثیر شوند (۳). قابلیت زیستی اندک پروبیوتیک‌ها در شرایط دشوار فرآورده‌های غذایی و شرایط اسیدی و صفراوی دستگاه گوارش، موجب پیدایش روش نوینی به نام ریزپوشانی گردید. ریزپوشانی عبارت است از پوشش دادن لایه‌ای از هیدروکلوئیدها به دور سلول‌های میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک و محصور کردن آن‌ها به‌منظور تفکیک از محیط، طوری که آزادسازی هدفمند سلول‌ها در مکان و زمان مناسب را به دنبال داشته باشد (۴). مزایای دیگر ریزپوشانی عبارت‌اند از حفاظت میکروارگانیسم‌ها در برابر باکتریوفاژها و

افزایش ماندگاری آن‌ها طی پروسه خشک کردن انجمادی (۵). در حال حاضر، روش‌های زیادی جهت ریزپوشانی وجود دارد. قبل از انتخاب یکی از آن‌ها باید به نکاتی از جمله شرایط موثر در زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها، نوع روش‌های فرآوری مواد غذایی، شرایط نگهداری محصولات فرآوری شده با پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده قبل از رسیدن به دست مصرف‌کننده، انتخاب روش ریزپوشانی و نوع مکانیسم رهاسازی پروبیوتیک‌ها، اندازه نهایی ذرات بطوری‌که احساس دهانی نامطلوب در مصرف‌کننده ایجاد نکند و هزینه‌های اعمال شده در قبال اثرات مفید، توجه شود. در ریزپوشانی در ابعاد میکرو اندازه ذرات احاطه شده (مانند ذرات جامد، قطرات کوچک مایع، گاز و یا باکتری‌ها) در یک پوشش به ابعاد ۱-۱۰۰۰ میکرون است. ولی ابعاد همین پوشش‌ها با تکنیک نانو بسیار ریزتر و بین ۱۰-۱۰۰ نانومتر است. در این مقاله روش‌های مورد استفاده در ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک در ابعاد میکرو و نانو مورد بررسی قرار گرفته است.

تکنیک های مورد استفاده در ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک

۲- میکرو ریزپوشانی Microencapsulation

۱-۲- تکنیک اکستروژن Extrusion technique

این تکنیک به دلیل سهولت کارکردن، هزینه‌های پایین و داشتن درصد بالای زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها، یکی از معروف‌ترین و پرکاربردترین روش‌هاست (۶) و شامل آماده‌سازی یک محلول هیدروکلوئیدی، افزودن سوسپانسیون باکتریایی به آن و خروج قطره‌ای این مخلوط، توسط سرنگ است. اگر تشکیل قطرات،

تحت شرایطی کنترل شده باشد به آن کپسول‌سازی قطره‌ای Prilling می‌گویند (برخلاف اسپری کردن یا پاششی) که با نوسان جریان یا لرزش نازل، انجام می‌شود. استفاده از جریان‌های هم‌محور یا یک میدان الکترواستاتیکی، یکی دیگر از روش‌های تولید قطرات ریز و کوچک است. هنگامی که یک جریان الکترواستاتیکی برقرار می‌شود، نیروی حاصل از آن سبب پراکندگی قطرات مایع نوک سرنگ و تولید جریان بارداری از قطرات کوچک‌تر می‌شود. در این روش نیازی به حلال‌های آلی نیست و کنترل اندازه ذرات به راحتی با تغییر جریان الکتریکی، ممکن است. تولید بیشتر ذرات با به کارگیری سیستم چند نازلی نیز امکان‌پذیر است (۷). ترکیبات بکار رفته با استفاده از این تکنیک به منظور ریزپوشانی عبارت‌اند از آلژینات کلسیم که به طور گسترده در ریزپوشانی باکتری‌های اسیدلاکتیک و پروبیوتیک‌ها در غلظت‌های ۰/۵-۰/۴ بکار می‌رود. از مزایای آن می‌توان به تشکیل شبکه ژل حول غشای باکتری‌ها، عدم اثرات سمی روی سلول یا بدن، قیمت ارزان و سهولت تهیه در شرایط آزمایشگاهی اشاره کرد. از طرفی عدم مقاومت به اسید و ایجاد چروک در محیط‌های حاوی اسیدلاکتیک از معایب آن است.

پروتئین آب‌پنیر: پروتئین آب‌پنیر مخلوطی از پروتئین‌های کروی است که از پنیر، هنگام تشکیل آن تولید می‌شود و به خوبی قادر است ترکیبات مهم غذایی را کپسوله کرده و بدین ترتیب آن‌ها را از دسترس آنزیم‌های تجزیه‌کننده در بدن، دورنگه دارد. Doherty و همکارانش در سال ۲۰۱۱، پروتئین‌های آب‌پنیر را جهت ریزپوشانی برخی

پروبيوتيك‌ها استفاده كردند. با اين روش آن‌ها توانستند زنده‌ماني پروبيوتيك‌ها را در محيط معده به مدت ۳ ساعت حفظ كنند (۸).

پكتين: پكتين هتروپلي ساكاريدي است كه از ميوه‌ها به دست مي‌آيد و به‌عنوان ژله در موادغذائي استفاده مي‌شود. Gebare و همكارانش در ۲۰۱۳، ميكروذرات پكتيني پوشش داده شده با پروتئين آب‌پنير توليد كردند كه اثر حفاظتي بيشترى بر روى لاکتوباسيلوس اسيدوفيلوس (*Lactobacillus acidophilus*)، در مقايسه با سلول‌هاي فاقد پوشش داشت (۹).

شير: شير خالص به‌عنوان يك عامل پوشينه‌دار كردن نيز مورد مطالعه قرارگرفته است. Shi و همكارانش در ۲۰۱۳، ميكروذرات شير پوشش داده شده با كاراجينان Carrageenan و دانه اقايا را به‌منظور حفاظت لاکتو باسيلوس بولگاريكوس *Lactobacillus bulgaricus* در شرايط مشابه شيره‌هاي معدى بررسى كرده و نتايج مثبت آن را گزارش كردند (۱۰).

كلاژن شبه انساني (HLC): Human like collagen: از طريق كلون كردن cDNA ژن كلاژن انساني در /شرشياكلی BL21 و بيان آن در اين ميزبان باكتريايى به‌دست مي‌آيد. Su و همكارانش در سال ۲۰۱۱ ابتدا ميكروذراتي با استفاده از آلزینات و HCL تهيه‌كرده و سپس كلاژن شبه‌انسانی را با تركيب فوق مخلوط كردند. اين امر منجر به افزايش پايدارى ميكروذرات (توسط تشكيل باندهای هيدروژنی درون‌مولكولی) و در نتيجه افزايش پايدارى و زنده‌ماني پروبيوتيك‌ها در شرايط مشابه دستگاه گوارش شد (۱۱).

۲-۲- تکنیک امولسیون سازی Emulsion technique: در روش امولسیون‌سازی حجم كمی از سلول يا پليمير (به‌عنوان فاز پراكنده) به حجم زيادی از روغن گیاهی

(به‌عنوان فاز پيوسته يا فراگیر) مانند روغن سویا، ذرت، آفتابگردان اضافه می‌شود. روش امولسیون به‌طور موفقیت‌آمیزی در ریزپوشانی باكتري‌های اسيدلاكتيك بكار می‌رود. اين روش به‌مراتب ساده‌تر بوده، ولی به دليل استفاده از روغن گیاهی برای ساخت امولسیون نسبت به روش اكستروژن هزينه بالاتری را می‌طلبد. در اين روش، در ادامه مخلوط حاصل از طريق هم‌زدن به‌خوبی همگن می‌شود تا امولسیون به دست آيد. زمانی كه امولسیون آب در روغن تشكيل شد، پليمير محلول (در اثر واكنش‌های نامتقاطع) نامحلول شده و ذراتی را در فاز روغنی ايجاد می‌كند (۱۲). در ادامه ميكروذرات با فيلتراسيون جدا می‌شود. اندازه ذرات به‌سرعت هم زدن بستگی دارد و عموماً بين ۲ ميلي‌متر تا ۲۵ ميكرون است. مهم‌ترين تركيباتی كه به‌منظور ریزپوشانی پروبيوتيك ها با استفاده از اين تكنيك استفاده شده است عبارتند از كاراگينان Carrageenan و مخلوط‌های آن (۱۳) و (۱۴)، سدیم كربوكسی متيل سلولز Sodium CarboxyMethyl Cellulose (NaCMC) (۱۵)، سلولز استات‌فتالات (CAP) Cellulose Acetate Phthalate، كيتوزان Chitosan (۱۶)، ژلاتين (۱۷)، پروتئين نخود Chickpea protein (۱۸).

۲-۳- تکنیک بسترسیال Fluid bed

در اين سيستم، سوسپانسيون سلولی به درون محفظه‌هایی كه جريان مایعی برقرار است، پاشيده و خشك می‌شود. مزيت اين روش، امکان كنترل كامل دما و هزينه‌های پايين و عيب آن سخت بودن تكنيك و زمان‌بر بودن آن است. قبل از خشك‌كردن، لازم است كه پروبيوتيك‌ها توسط محيط‌هایی مانند شير خشك Skimmed milk، آلزینات كلسيم يا چربی

تحت پوشش قرار بگیرند. شلاک Shellac نوعی محصول رزینی خالص شده از حشره‌ای به نام *Kerria lacca* است و علاوه بر اینکه به عنوان یک مکمل غذایی مورد قبول است، به دلیل مقاومت بالا در برابر شیرهای گوارشی به عنوان یک عامل پوشش دار کردن پروبیوتیک‌ها با استفاده از این تکنیک کاربرد دارد (۱۹). ترکیب دیگر مورد استفاده با این تکنیک پروتئین مایه پنیر *Rennet-gelled protein* است (۲۰). این ریزپوشینه‌ها قادرند پروبیوتیک‌ها را به خوبی پوشش داده و زنده‌مانی سلول‌ها را به دلیل pH بالای پوشش داخلی که توسط ظرفیت بافری پروتئین حاصل می‌شود، افزایش دهد. از طرفی این امر می‌تواند سلول‌ها را در شرایط مشابه شیرهای گوارشی که pH اسیدی دارند، به خوبی حفظ کند. کنترل اندازه ذرات نیز با استفاده از این پروتئین‌ها به خوبی ممکن بوده و همین عوامل سبب شده که این تکنیک در زمینه‌ی پروبیوتیک‌های مواد غذایی بسیار سودمند و پرکاربرد باشد.

۲-۴- خشک کردن انجمادی Freeze Drying

چندین دهه است که این تکنیک برای نگهداری پروبیوتیک‌ها به صورت پودری استفاده می‌شود. ولی تلفیق دو تکنیک ریز پوشانی و لیوفلیزه کردن، مبحث جدیدی است که در آن، سلول‌ها ابتدا فریز شده و سپس در شرایط خلا، خشک می‌شوند و درصد زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در این تکنیک در مقایسه با خشک‌کن پاششی *Spray drying* بیشتر است (۲۱). چون احتمال آسیب دیدگی دیواره سلول‌ها، طی این فرایند زیاد است، لذا از ترکیبات مختلفی مانند شیر خشک، پروتئین آب پنیر، گلوکز، مالتودکسترین،

ترهالوز و ... به عنوان حفاظت کننده در برابر سرما به محیط کشت پروبیوتیک‌ها قبل از این پروسه اضافه می‌شود. این ترکیبات ممکن است به محیط کشت پروبیوتیک‌ها قبل از تخمیر به منظور افزایش سازش پذیری نیز افزوده شود (۲۲).

۲-۵- خشک‌کن پاششی

خشک کردن پاششی معمول‌ترین و قدیمی‌ترین روش جهت ریزپوشانی مواد غذایی است. همچنین برای مولکول‌های غذایی فعال و هم برای پروبیوتیک‌های زنده به کار می‌رود. خشک کردن پاششی فرآیندی ارزان و سریع است و زمانی که به قدر کافی انجام شود، به میزان زیادی تجدیدپذیر است. انرژی مصرف شده در آن ۶ تا ۱۰ برابر کمتر از خشک‌کن انجمادی است. هزینه پایین و آسودگی نسبی، مهم‌ترین دلیل برای کاربرد گسترده این روش در صنعت است. نگهداری و حفظ مواد هسته در طی ریزپوشانی با این روش، بستگی به خواص امولسیون و ترکیب آن و شرایط خشک کردن دارد (۲۳). کوتاه بودن زمان و تبخیر سریع آب، درجه حرارت مواد هسته را زیر ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگه می‌دارد. این فناوری معایبی هم دارد، به عنوان مثال در کاربرد برای پروبیوتیک‌های زنده، به دلایل آگیری که رخ می‌دهد مشکلاتی ایجاد می‌کند. محدودیت دیگر دمای بالایی است که جهت تثبیت مورد نیاز بوده و برای همه انواع پروبیوتیک‌ها سازگار نیست. مثلاً نشان داده شده است که بیفیدوباکتری‌ها *Bifidobacteria* به دمای ورودی حساس هستند (۲۴).

۲-۶- خشک‌کن دو مرحله‌ای Two step drying

پروبیوتیک‌ها معمولاً توسط خشک‌کن پاششی در دماهای بالای ورودی و خروجی، خشک می‌شوند که

به‌كارگيري چنين دماهايي ميزان زنده‌ماني را كاهش مي‌دهد. بهينه‌سازي شرايط به‌منظور افزايش درصد زنده‌ماني در طول زمان نگهداري، ضروري است. بدين منظور Ledeboer و Chávez در ۲۰۰۷ سامانه‌اي را طراحي كردند كه در آن از دو روش خشك‌كن پاششي و خشك‌كردن در خلا با دماي متوسط ۴۵ درجه سانتي‌گراد استفاده مي‌شد. نتايج نشان داد كه پروسه خشك كردن دو مرحله‌اي، زنده‌ماني پروبيوتيك‌ها در مواد غذايي را افزايش مي‌دهد. از طرفي در مقايسه با خشك‌كردن انجمادي، سه برابر ارزان‌تر است (۲۵).

۲-۷- خشك‌كردن انجمادي پاششي Spray Freeze drying

در اين تكنيك، پروبيوتيك‌ها به‌صورت سوسپانسه‌شده و جدا از هم به يك محلول سرد كننده مانند نيتروژن مايع وارد مي‌شوند. اين امر منجر به توليد قطرات ريز فريز شده مي‌شود كه در ادامه منتقل به فريز دراير شده و خشك مي‌شوند (۲۶). مزيت اين روش عبارت‌اند از امكان كنترل اندازه ذرات، ايجاد سطح بزرگ‌تر در مقايسه با روش خشك‌كن پاششي و لايه‌پوشاني بيشتر كپسول‌ها كه سبب افزايش بيشتر محافظت در برابر شرايط محيطي مي‌شود (۲۷). از معايب اين تكنيك مي‌توان به مصرف بالاي انرژي، مدت‌زمان طولاني و ۳۰ تا ۵۰ برابر گران‌تر بودن نسبت به خشك‌كن پاششي، اشاره كرد (۲۸). Semyonov و همكارانش (۲۰۱۰) از مالتودكسترين كه از تركيبات ماتريكس ديواره سلولي است و سبب كاهش حركت سلول‌ها مي‌شود و هم‌چنين از ترهالوز به‌عنوان يك تركيب محافظت‌كننده، استفاده كردند. اين تركيبات قادرند زنده‌ماني باكتري‌ها را طي فرايندهايي مانند

فريز كردن و خشك‌كردن انجمادي حفظ كنند. بطوري‌كه ترهالوز قادر است اتصالات هيدروژني بين پروتين‌ها و گروه‌هاي قطبي غشاي چربي سلول‌ها ايجاد كرده و مانع آسيب‌ديدن ساختار سلولي هنگام دهيدراتاسيون شود. نويسنده نشان داده كه اين تكنيك روش مناسبی جهت توليد ريز پوشينه‌هاي حاوي لاکتوباسیلوس پاراکازئی *Lactobacillus paracasei* با در صد زنده‌ماني بالا در طول مراحل منجمد كردن و خشك‌كردن است (۲۷).

۲-۸- اسپري چيلينگ Spray chilling

اين تكنيك تحت عنوان سردكردن پاششي و انجماد پاششي نيز مطرح است و بسيار شبیه خشك‌كن پاششي است. اين تكنيك مبتني بر تزريق هوای سرد است كه منجر به جامد شدن ذرات مي‌شود. بطوري‌كه ابتدا يك محلول مايع كه حاوي تركيبات زنده است آماده شده، سپس هنگام پاشيدن و تماس با هوای سرد به‌سرعت جامد مي‌شود (۲۹). در اين تكنيك بيشتر از حامل‌هايي با بستر چربي استفاده مي‌شود و ارزان‌ترين روش پوشينه‌دار كردن است. از طرفي براي توليد پوشينه‌هاي كوچك‌تر كه در فراوري غذايي مناسب است، استفاده مي‌شود (۳۰). از معايب اين تكنيك مي‌توان به ظرفيت پايين پوشينه‌داركردن و تركيدن هسته مواد، طي زمان ذخيره و نگهداري اشاره كرد. Pedroso و همكاران (۲۰۱۲) از اين تكنيك جهت ريزپوشاني بيفيدوباکتریوم لاکتیس *Bifidobacterium lactis* و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با استفاده از تركيبات ديواره و پالم، استفاده كردند. ميكروذرات چربي جامد در حفاظت پروبيوتيك‌ها در مسير عبوري دستگاه گوارش و شيره‌هاي گوارشي موثر بوده از طرفي قابليت نگهداري در دماهاي پايين را نيز داشتند

(۳۱).

۹-۲- خشک کن پاششی فراصوت تحت

خلا Ultrasonic vacuum spray dryer

این روش مبتنی بر خشک کن پاششی به همراه کاهش میزان اکسیداسیون و اثرات حرارتی نامطلوب است که ممکن است در طول پروسه اتفاق بیفتد. در این سیستم از نازل های اولتراسونیک، دماهای پایین و شرایط خلا در محفظه خشک کن استفاده می شود. Semyonov و همکاران (۲۰۱۱) ترکیبی از مالتودکسترین و ترهالوز را برای ریزپوشانی پروبیوتیک ها استفاده کرده و نشان دادند که این ترکیبات قادرند زنده مانده پروبیوتیک ها را با حفظ یکپارچگی غشای سلولی طی فرآیند خشک شدن و نگهداری افزایش دهند (۳۲).

۱۰-۲- سیستم هیبریدی Hybridisation system

یک نوع سیستم پوشینه دار کردن خشک است که شامل یک گردونه با سرعت گردش بالا و ۶ پره و یک مدار گردش پودری است. مخلوط پودری (شامل ذرات میزبان و میهمان) به مخزنی هدایت می شود که بیشترین تماس را با جریان هوای تولید شده توسط چرخش پره ها با سرعت بالا دارد. در طول پروسه به طور منظم ذرات جدید (مهمان) از متصل شدن به سطح ذرات قدیمی (میزبان) حاصل می شوند. طی این سیستم و هنگام تشکیل ریز پوشینه ها مقداری حرارت ایجاد می شود که ممکن است به باکتری ها آسیب بزند. لذا سیستم سردکننده ای تعبیه شده است که دما را به زیر ۳۰ درجه سانتی گراد می رساند (۳۳). از این روش و برخی ترکیبات پری بیوتیکی مانند سوربیتول، مانیتول، لاکتوز، زایلیتول، اینولین، فروکتوالیگوساکارید

و رافینوز به منظور ریزپوشانی مضاعف پروبیوتیک ها استفاده شد و نتایج مثبت قابل توجهی ارائه شد (۳۴).

۱۱-۲- تکنیک اتصال و پیوند آئروسول ها

Impinging aerosol technology

در این روش از پیوند زدن آئروسول های جدا از هم استفاده می شود. یکی شامل سوسپانسیون میکروبی تهیه شده در آلزینات و دیگری تهیه شده در کلرید کلسیم بطوری که مخلوط آلزینات از بالای محفظه و کلرید کلسیم از پائین آن تزریق می شود. در این روش ریزپوشینه های آلزینات با ابعاد کمتر از ۴۰ میکرومتر تولید می شوند (۳۵). به دلیل این که در این روش از هیچ گونه حرارت و حلالی استفاده نمی شود، می تواند جهت پوشینه دار کردن ترکیبات حساس به حرارت و حلال استفاده شود. سهیلی و همکاران (۲۰۱۲) در تحقیقی نشان دادند که ریزپوشانی باکتری های زنده *Lactobacillus GG* و *rhamnosus* لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس NCFM با این روش، آن ها را قادر می کند در آب پرتقال با دمای ۲۵ درجه به مدت ۹ روز و در دمای ۴ درجه به مدت ۳۵ روز زنده بمانند (۳۶).

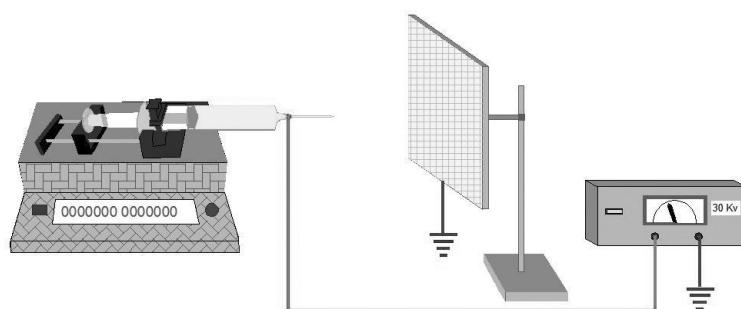
۱۲-۲- الکترورسی Electrospinning

الکترورسی فرآیندی ساده ای است. محلول یا مذاب پلیمری با نرخ جریان مناسب و بهینه از سوزن باریک سرنگی خارج می شود. سوزن یا نازل هم زمان الکتروود هم است و با یک منبع برق ولتاژ بالا باردار شده و پتانسیل الکتریکی بالایی که بین ۵ تا ۳۰ کیلوولت در فضای بین سوزن سرنگ و یک جمع کننده فلزی که بلافاصله ۱۰ تا ۲۵ سانتیمتر قرار گرفته است، ایجاد می کند. میدان الکتریکی بین نوک سوزن و کلکتور

"رجب زاده شانديز و حسيني نژاد، مروري بر انواع روش‌هاي ميكروريزپوشاني..."

مناسب، بارهاي سطحي قطره بر كشتش سطحي غلبه مي‌كند و يك الياف كشيده شده به سمت جمع كننده توليد مي‌كند و بار الكتريكي جريان را به هدف متصل به زمين شتاب مي‌دهد (شكل ۲).

باعث كشيدن قطره محلول پليمري و تغيير شكل آن بر اساس نيروهاي الكترواستاتيكي مي‌شود. اين باعث تغيير شكل قطره نيمه‌كروي به يك‌شكل قيفي مي‌شود كه قيف تيلور ناميده مي‌شود. در زمان رسيدن به ولتاژ



شكل ۲- نمایی از ابزار مورد استفاده در تکنیک الکتروریسی

پليمري از نانو ذرات تكي هستند. مورد اول قطعا قابليت ريزپوشاني پروبيوتيك‌ها را ندارند، ولي نوع دوم اين توانائي را دارا است. امروزه بيشتر از ريز پوشاني در ابعاد ميكرو استفاده مي‌شود، اما كارهايي هرچند اندك با استفاده از تكنيك نانو نيز انجام شده است، كه در حال گسترش است. در ادامه به برخي از كارهاي انجام شده اشاره مي‌شود. نانو لايه‌هاي خودآرا Electrostatic layer-by-layer self-assembly تكنيك متداول و جديدي جهت ريزپوشاني پروبيوتيك‌ها در ابعاد نانو است. در اين تكنيك، ابتدا مولكول‌هاي شيميايي هدف، لايه‌اي با ضخامت كمتر از نانومتر را روي سطح مورد نظر (باكتري) تشكيل داده، سپس نانولايه‌هاي بعدي به اين لايه اضافه شده و بر روي يكديگر قرار مي‌گيرند. استفاده از جاذبه‌ي الكترواستاتيكي يكي از روش‌هاي موجود جهت پوشش‌دهي سطح موردنظر با نانو لايه‌هاي خودآرا است.

مزيت اين تكنيك توليد فيبرها يا كپسول‌هاي بسيار نازك در حد چند نانومتر با سطح وسيع است. از طرفي امكان توليد زياد به همراه سادگي اين روش سبب كاربردهاي مختلف آن شده است (۳۷). جهت ريزپوشاني پروبيوتيك‌ها با استفاده از اين روش از بسترهاي پروتئيني (آب‌پنير تغليظ شده) و كربوهيدراتي (جوانه‌ها) استفاده مي‌شود. در ريز پوشاني پروبيوتيك‌ها با پروتئين‌هاي آب‌پنير درصد زنده‌ماني در مقايسه با كربوهيدرات جوانه‌ها بيشتر است (۳۸).

۳- نانوپوشش‌دهي

نكته‌اي كه در ابتدا بايد به آن اشاره كرد اين است كه آيا مي‌توان پروبيوتيك‌ها را كه در ابعاد ميكرو هستند در پوشش‌هايي با ابعاد نانو قرارداد؟ جهت پاسخ‌گويي به اين سوال توجه به اين نكته ضروري است كه نانو ذرات دو نوع هستند. يكي از آن‌ها به‌صورت نانو ذرات منفرد و تكي و ديگري متشكل از كمپلكس يا

فرآیند خودآرایی به واسطه در معرض قرار گرفتن سطحی باردار در برابر محلولی از پلی الکترولیت با شارژ مخالف، آغاز می شود. میزان ماده جذب شده به واسطه دانسیته بار قابل کنترل بوده و به صورت خود محدود شونده است. در شرایط مناسب یون های متعدد جذب شده با عدد استوکیومتری بیشتر از بار نسبی، جذب سطح شده و باعث تغییر علامت بار موجود روی سطح می شوند. به همین ترتیب هنگامی که سطح در معرض محلول دوم که شامل پلی یون ها با بار مخالف است قرار می گیرد، لایه ای دیگر با بار مخالف روی لایه ی قبلی تشکیل می شود و تکرار این عمل با تغییر جذب پلی آنیون و پلی کاتیون، باعث رشد تدریجی نانو لایه ها با ضخامت مورد نظر می شود. در این تکنیک امکان کنترل دقیق ضخامت، یکنواختی و توالی نانو لایه ها ممکن است. Franz و همکاران (۲۰۱۰) توانستند با استفاده از تکنیک نانو لایه های خودآرای الکترواستاتیک-Electrostatic layer nanoselfassembly (LbL) by-layer سویه های مختلف باکتریایی مانند /شرشیاکلی و مخمری مانند آرکسولا /ادنینیورانس *LS Arxula adeninivorans* ۳ را بدون از دست دادن فعالیت متابولیکی نانوریز پوشانی کنند. بطوری که افزایش لایه های پلی مریک توانست یک سد فیزیکی بین سلول و محیط اطرافش پدید آورد (۳۹). در تحقیق دیگری Priya و همکاران (۲۰۱۱) همین تکنیک را جهت نانوریزپوشانی لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس با استفاده از ترکیباتی مانند کیتوزان CHI و کربوکسی متیل سلولز CMC بکار بردند. بررسی های آن ها محافظت بسیار خوب باکتری را در برابر شیرهای گوارشی نشان داد. قرارگیری

باکتری محافظت نشده در شرایط سیستم گوارشی به مدت ۲ ساعت، سبب مرگ کامل آن شد. در صورتی که باکتری پوشش داده شده با ۳ نانو لایه (کیتوزان/ کربوکسی متیل سلولز/ کیتوزان) باعث حفظ ۳۳٪ از باکتری ها به صورت زنده در همان شرایط شد (۴۰) تکنیک الکتروریسی Electrospinning نوع دیگری است که به منظور نانوریزپوشانی پروبیوتیک ها مورد توجه و استفاده است. اولین بار که این روش بدین منظور به کار برده شد، توسط Fung و همکارانش (۲۰۱۱) بود بطوری که توانستند با استفاده از این روش نانوفیبرهایی از روغن پالم و سویا تهیه کرده و جهت پوشش دهی لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس بکار گیرند (۴۱).

پور جعفر و همکاران (۱۳۹۵) توانستند با استفاده از تکنیک ضد حلال فوق بحرانی Supercritical Antisolvent Technique (SAS)، ماده اودوراژیت ۱۰۰S را در ابعاد نانو، تولید کرده و به عنوان لایه سوم پوشش دهی، به همراه دو ترکیب آلژینات کلسیم و کیتوزان جهت ریزپوشانی لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس بکار گیرند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ریزپوشانی و پوشینه سازی با آلژینات کلسیم-کیتوزان- اودوراژیت نقش موثری در حفاظت از باکتری لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس تحت شرایط محلول اسید هیدروکلریک، محلول بافر فسفات و محلول حاوی پودر دایجستیو با و بدون تنش مکانیکی ایفا کرده و میزان بقای باکتری های ریزپوشانی شده در تمام شرایط، به طور معنی داری بالاتر از باکتری های آزاد بود.

۴- نتیجه گیری

"رجب زاده شانديز و حسيني نژاد، مروري بر انواع روش‌هاي ميكروريزپوشاني..."

اين حوزه همواره احساس مي‌شود. تحقيقات بيشتر به منظور دستيابي به حامل‌هاي مناسب و سويه‌هاي باكتريايي در حال انجام است از طرفي، کاهش هزينه‌ها توسط توسعه فناوري‌هاي آسان‌تر، اثرات سلامت‌بخشي بيشتر و تركيبات باكتريايي كم‌هزينه‌تر نيز بايد مدنظر محققين حوزه نانو و فناوري مواد غذايي قرار گيرد.

تكنيك ريزپوشاني يكي از موثرترين روش‌ها جهت حفظ زنده‌ماني و پايداري پروبيوتيك‌ها است و مي‌تواند محافظتي در برابر پروسه‌هاي فراوري مواد غذايي و ذخيره‌سازي باشد. علاوه بر پلي‌ساكاريدها كه به‌صورت سنتي در ريزپوشاني استفاده مي‌شود، مواد و فناوري‌هاي جديدي نيز مانند الكتروريسي و استفاده از تركيبات پوشش‌دهنده در حد ميكرومتر و نانومتر نيز گسترش‌يافته است. اما نياز به توسعه در

References

فهرست منابع

- ۱- پورجعفره، نوري ن، نصرآبادي گ، بستي آ. (۲۰۱۶). مطالعه نقش حفاظتي دانك‌هاي دوپوشين‌هاي آلژينات كلسيم- كيتوزان-نانوذرات اودوراژيت S100 حاصل از ريزپوشاني باكتري لاكتوباسيلوس اسيدوفيلوس به عنوان فلور غالب روده انسان و حيوانات. مجله تحقيقات دامپزشكي ۷۱(۳): ۳۱۱-۳۲۰.
- 2- Solanki HK, Pawar, D.D., Shah, D.A., Prajapati, V.D., Jani, G.K., Mulla, A. M., & Thakar, P. M. (2013) Development of Microencapsulation Delivery System for Long-Term Preservation of Probiotics as Biotherapeutics Agent. BioMed Research International, 1- 21.
- 3- Burgain J, Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J (2011) Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. Journal of Food Engineering: 467-483.
- 4- Sanz Y (2007) Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of Bifidobacterium: A way of selecting improved probiotic strains. International Dairy Journal: 1284- 1289.
- 5- Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, et al. (2000) Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International journal of food microbiology 62: 47-55.
- 6- Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S (2007) Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Iranian Journal of Biotechnology 5: 1-18.
- 7- Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth HC (2006) Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT-and conventionally treated milk during storage. LWT-Food Science and Technology 39: 177-183.
- 8- Kailasapathy K (2002) Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. Current issues in intestinal microbiology 3: 39-48.
- 9- Doherty S, Gee V, Ross R, Stanton C, Fitzgerald G, et al. (2011) Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. Food Hydrocolloids 25: 1604-1617.
- 10- Gebara C, Chaves KS, Ribeiro MCE, Souza FN, Grosso CR, et al. (2013) Viability of Lactobacillus acidophilus La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. Food Research International 51: 872-878.
- 11- Shi L-E, Li Z-H, Li D-T, Xu M, Chen H-Y, et al. (2013) Encapsulation of probiotic

- Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering* 117: 99-104.
- 12- **Su R, Zhu X-L, Fan D-D, Mi Y, Yang C-Y, et al. (2011)** Encapsulation of probiotic *Bifidobacterium longum* BIOMA 5920 with alginate–human-like collagen and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *International journal of biological macromolecules* 49: 979-984.
- 13- **Heidebach T, Först P, Kulozik U (2012)** Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Critical reviews in food science and nutrition* 52: 291-311.
- 14- **Miles M, Morris V, Carroll V (1984)** Carob gum- κ -carrageenan mixed gels: mechanical properties and x-ray fiber diffraction studies. *Macromolecules* 17: 2443-2445.
- 15- **Audet P, Paquin, C., Lacroix, C (1988)** Immobilized growing lactic acid bacteria with κ -carrageenan locust bean gum gel. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 11-18.
- 16- **Kamel S, Ali N, Jahangir K, Shah S, El-Gendy A (2008)** Pharmaceutical significance of cellulose: a review. *Express Polym Lett* 2: 758-778.
- 17- **Groboillot A, Champagne C, Darling G, Poncelet D, Neufeld R (1993)** Membrane formation by interfacial cross-linking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Biotechnology and bioengineering* 42: 1157-1163.
- 18- **Hyndman CL, Groboillot AF, Poncelet D, Champagne CP, Neufeld RJ (1993)** Microencapsulation of *Lactococcus lactis* within cross-linked gelatin membranes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 56: 259-263.
- 19- **Wang J, Korber DR, Low NH, Nickerson MT (2014)** Entrapment, survival and release of *Bifidobacterium adolescentis* within chickpea protein-based microcapsules. *Food Research International* 55: 20-27.
- 20- **Stummer S, Salar-Behzadi S, Unger FM, Oelzant S, Penning M, et al. (2010)** Application of shellac for the development of probiotic formulations. *Food Research International* 43: 1312-1320.
- 21- **Bansal N, Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H (2007)** Aggregation of rennet-altered casein micelles at low temperatures. *Journal of Agricultural Food Chemistry*: 3120-3126.
- 22- **Wang Y-C, Yu R-C, Chou C-C (2004)** Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology* 93: 209-217.
- 23- **Basholli-Salihi M, Mueller M, Salar-Behzadi S, Unger FM, Viernstein H (2014)** Effect of lyoprotectants on β -glucosidase activity and viability of *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and storage in milk and low pH juices. *LWT-Food Science and Technology* 57: 276-282.
- 24- **Dunne C (2001)** Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. *Inflammatory bowel diseases* 7: 136-145.
- 25- **O'riordan K, Andrews D, Buckle K, Conway P (2001)** Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of applied microbiology* 91: 1059-1066.
- 26- **Chavez BE, & Ledebor, A. M (2007)** Drying of probiotic: Optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology*: 1193-1201.
- 27- **Amin T, Thakur M, Jain S (2013)** Microencapsulation-the future of probiotic cultures. *The*

"رجب زاده شانديز و حسيني نژاد، مروري بر انواع روش هاي ميكروريزپوشاني..."

Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 3: 35.

28. **Semyonov D, Ramon O, Kaplun Z, Levin-Brener L, Gurevich N, et al. (2010)** Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International* 43: 193-202.
- 29- **Zuidam NJ, Shmoni E (2010)** Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*: Springer. pp. 3-29.
- 30- **Champagne CP, & Fustier, P (2007)** Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Food Biotechnology*: 184-190.
- 31- **Gouin S (2004)** Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in food science & technology* 15: 330-347.
32. **de Lara Pedrosa D, Thomazini M, Heinemann RJB, Favaro-Trindade CS (2012)** Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. *International Dairy Journal* 26: 127-132.
33. **Semyonov D, Ramon O, Shmoni E (2011)** Using ultrasonic vacuum spray dryer to produce highly viable dry probiotics. *LWT-Food Science and Technology* 44: 1844-1852.
34. **ISHIZAKA T, HONDA H, KOISHI M (1993)** Drug Dissolution from Indomethacin-starch Hybrid Powders Prepared by the Dry Impact Blending Method. *Journal of pharmacy and pharmacology* 45: 770-774.
35. **Ann EY, Kim, Y., Oh, S., Imm, J.Y., Park D.J., Han, K. S. & Kim, S.H. (2007)** Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. *International Journal of Food Science and Technology*: 411-419.
36. **Sohail A, Turner MS, Coombes A, Bostrom T, Bhandari B (2011)** Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology* 145: 162-168.
37. **Sohail A, Turner MS, Prabawati EK, Coombes AG, Bhandari B (2012)** Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. *International journal of food microbiology* 157: 162-166.
38. **Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A (2008)** Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 49: 5603-5621.
39. **López-Rubio A, Sanchez E, Wilkanowicz S, Sanz Y, Lagaron JM (2012)** Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids* 28: 159-167.
40. **Franz B, Balkundi SS, Dahl C, Lvov YM, Prange A (2010)** Layer-by-Layer Nano-Encapsulation of Microbes: Controlled Cell Surface Modification and Investigation of Substrate Uptake in Bacteria. *Macromolecular bioscience* 10: 164-172.
41. **Priya AJ, Vijayalakshmi S, Raichur AM (2011)** Enhanced survival of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by encapsulation with nanostructured polyelectrolyte layers through layer-by-layer approach. *Journal of agricultural and food chemistry* 59: 11838-11845.
42. **Fung W-Y, Yuen K-H, Liong M-T (2011)** Agrowaste-based nanofibers as a probiotic encapsulant: fabrication and characterization. *Journal of agricultural and food chemistry* 59: 8140-8147.

A Review on the Main Methods of Microencapsulation and Nanoenvelopment of Probiotics

Safiyeh Rajabzadeh Shandiz, Marzieh Hosseini Nejad *

Research Institute of Food Science and Technology, Biotechnology Department, Mashhad, Iran

m.hosseininezhad@rifst.ac.ir

Abstract

Providing probiotics with a physical barrier is an efficient approach to protect microorganisms and to deliver them into the gut. In this case, encapsulation is a technique for putting probiotics in small capsules to enhance efficiency during processing and controlling of delivery in gut. Microencapsulation does not utilize capsules greater than 3 mm in length. Encapsulations that fall within the range of 1µm to 1000µm are classified as microencapsulation. Components between 1 nm and 100 nm are classified as nanocapsules or nanoenvelopment. This review focuses mainly on the methodological approach of probiotic microencapsulation and nanoenvelopment including materials, methods, advantages and disadvantages in food industry.

Key Words: Probiotics Bacteria; Encapsulation; Microcapsule; Nanoenvelop