مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۰، شماره ٤، زمستان ۱۳۹٦

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 کارآیی 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 پروبیوتیک ها به همراه مواد، روش‌ها، مزایا و معایب آن‌ها در صنعت غذا پرداخته‌شده 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 *باسیلوس‌سرئوس* در کنار برخی مخمرها، به‌ویژه *ساکارومایسس‌سرویزیه* 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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.2.7]

افزایش ماندگاری آن‌ها طی پروسه خشک‌کردن 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 موادغذایی، شرایط نگهداری محصولات فرآوری‌شده 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 قرارگرفته است.

تکنیک های مورد استفاده در ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک

۲– میکروریزپوشانی Microencapsulation

۲–۱– 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. هنگامی‌که 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 به‌راحتی با تغییر جریان الکتریکی، ممکن است. تولید بیشتر ذرات با به‌کارگیری سیستم چند نازلی نیز امکان‌پذیر است (۷). ترکیبات بکار رفته با استفاده از این تکنیک به‌منظور ریز پوشانی عبارت‌اند از آلژینات کلسیم که به‌طور گسترده در ریز پوشانی باکتری‌های اسیدلاکتیک و پروبیوتیک‌ها در غلظت‌های ۴٪–۰/۵ 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 به‌خوبی 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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.2.7]

پروبیوتیک‌ها استفاده کردند. با این روش آن‌ها توانستند زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها را در محیط معده به مدت ۳ ساعت حفظ کنند (۸).

پکتین: پکتین هتروپلی‌ساکاریدی است که از میوه‌ها به دست می‌آید و به‌عنوان ژله در موادغذایی استفاده می‌شود. Gebare و همکارانش در ۲۰۱۳، میکروذرات پکتینی پوشش داده شده با پروتئین آب‌پنیر تولید کردند که اثر حفاظتی بیشتری بر روی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*)، در مقایسه با سلول‌های فاقد پوشش داشت (۹).

شیر: شیر خالص به‌عنوان یک عامل پوشینه‌دار کردن نیز مورد مطالعه قرارگرفته است. Shi و همکارانش در ۲۰۱۳، میکروذرات شیر پوشش داده شده با کاراجینان Carrageenan و دانه اقاقیا را به‌منظور حفاظت لاکتو باسیلوس بولگاریکوس *Lactobacillus bulgaricus* در شرایط مشابه شیره‌های معدی بررسی کرده و نتایج مثبت آن را گزارش کردند (۱۰).

کلاژن شبه انسانی(Human like collagen (HLC:

از طریق کلون کردن cDNA ژن کلاژن انسانی در *اشرشیاکلی* BL21 و بیان آن در این میزبان باکتریایی به‌دست می‌آید. Su و همکارانش در سال ۲۰۱۱ ابتدا میکروذراتی با استفاده از آلژینات و HCL تهیه‌کرده و سپس کلاژن شبه‌انسانی را با ترکیب فوق مخلوط کردند. این امر منجر به افزایش پایداری میکروذرات (توسط تشکیل باندهای هیدروژنی درون‌مولکولی) و در نتیجه افزایش پایداری و زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در شرایط مشابه دستگاه گوارش شد (۱۱).

۲-۲- تکنیک امولسیون سازیEmulsion technique

در روش امولسیون‌سازی حجم کمی از سلول یا پلیمر (به‌عنوان فاز پراکنده) به حجم زیادی از روغن گیاهی (به‌عنوان فاز پیوسته یا فراگیر) مانند روغن سویا، ذرت، آفتابگردان اضافه می‌شود. روش امولسیون به‌طور موفقیت‌آمیزی در ریزپوشانی باکتری‌های اسیدلاکتیک بکار می‌رود. این روش به‌مراتب ساده‌تر بوده، ولی به دلیل استفاده از روغن گیاهی برای ساخت امولسیون نسبت به روش اکستروژن هزینه بالاتری را می‌طلبد. در این روش، در ادامه مخلوط حاصل از طریق هم‌زدن به‌خوبی همگن می‌شود تا امولسیون به دست آید. زمانی که امولسیون آب در روغن تشکیل شد، پلیمر محلول (در اثر واکنش‌های نامتقاطع) نامحلول شده و ذراتی را در فاز روغنی ایجاد می‌کند (۱۲). در ادامه میکروذرات با فیلتراسیون جدا می‌شود. اندازه ذرات به‌سرعت هم زدن بستگی دارد و عموما بین ۲ میلی‌متر تا ۲۵ میکرون است. مهم‌ترین ترکیباتی که به‌منظور ریزپوشانی پروبیوتیک ها با استفاده از این تکنیک استفاده شده است عبارتند از کاراگینان Carrageenan و مخلوط‌های آن (۱۳) و (۱۴)، سدیم‌کربوکسی متیل‌سلولز Sodium CarboxyMethyl Cellulose (NaCMC) (۱۵)، سلولز استات‌فتالات(Cellulose Acetate Phthalate (CAP، کیتوزان Chitosan (۱۶)، ژلاتین (۱۷)، پروتئین نخود Chickpea protein(۱۸).

۲-۳- تکنیک بسترسیال Fluid bed

در این سیستم، سوسپانسیون سلولی به درون محفظه‌هایی که جریان مایعی برقرار است، پاشیده و خشک می‌شود. مزیت این روش، امکان کنترل کامل دما و هزینه‌های پایین و عیب آن سخت بودن تکنیک و زمان‌بر بودن آن است. قبل از خشک‌کردن، لازم است که پروبیوتیک‌ها توسط محیط‌هایی مانند شیر خشک Skimmed milk، آلژینات کلسیم یا چربی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.2.7]

تحت پوشش قرار بگیرند. شلاک Shellac نوعی محصول رزینی خالص‌شده از حشره‌ای به نام Kerria lacca است و علاوه بر اینکه به‌عنوان یک مکمل غذایی مورد قبول است، به دلیل مقاومت بالا در برابر شیره‌های گوارشی به‌عنوان یک عامل پوشش‌دارکردن پروبیوتیک‌ها با استفاده از این تکنیک کاربرد دارد (۱۹). ترکیب دیگر مورد استفاده با این تکنیک پروتئین مایه‌پنیر Rennet-gelled protein است (۲۰). این ریزپوشینه‌ها قادرند پروبیوتیک‌ها را به‌خوبی 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 شیره‌های گوارشی که pH اسیدی دارند، به‌خوبی حفظ کند. کنترل اندازه ذرات نیز با استفاده از این پروتئین‌ها به‌خوبی ممکن بوده و همین عوامل سبب شده که این تکنیک در زمینه‌ی پروبیوتیک‌های مواد غذایی بسیار سودمند و پرکاربرد باشد.

۲-۴- خشک‌کردن انجمادی Freeze Drying

چندین دهه است که این تکنیک برای نگهداری پروبیوتیک‌ها به‌صورت پودری استفاده می‌شود. ولی تلفیق دو تکنیک ریز پوشانی و لیوفیلیزه‌کردن، 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 آسیب‌دیدگی دیواره سلول‌ها، طی این فرایند زیاد است، لذا از ترکیبات مختلفی مانند شیر خشک، پروتئین آب‌پنیر، گلوکز، مالتودکسترین، ترهالوز و ... به‌عنوان 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 به‌منظور افزایش سازش‌پذیری نیز افزوده شود (۲۲).

۲-۵- خشک‌کن پاششی

خشک‌کردن پاششی معمول‌ترین و قدیمی‌ترین روش جهت ریزپوشانی موادغذایی است. همچنین برای مولکول‌های غذایی فعال و هم برای پروبیوتیک‌های زنده به کار می‌رود. خشک‌کردن پاششی فرآیندی ارزان و سریع است و زمانی که به‌قدر کافی انجام شود، به میزان زیادی تجدیدپذیر است. انرژی مصرف‌شده 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 خشک‌کردن 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، به‌عنوان‌مثال در کاربرد برای پروبیوتیک‌های زنده، به دلایل آبگیری که رخ می‌دهد مشکلاتی ایجاد می‌کند. محدودیت دیگر دمای بالایی است که جهت تثبیت مورد نیاز بوده و برای همه انواع پروبیوتیک‌ها سازگار نیست. مثلا نشان داده شده است که بیفیدوباکتری‌ها *Bifidobacteria* به دمای ورودی حساس هستند (۲۴).

۲-۶- خشک‌کن دو مرحله‌ای Two step drying

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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.2.7]

به‌کارگیری چنین دماهایی میزان زنده‌مانی را کاهش می‌دهد. بهینه‌سازی شرایط به‌منظور افزایش درصد زنده‌مانی در طول زمان نگهداری، ضروری است. بدین منظور Chávez و Ledeboer در ۲۰۰۷ سامانه‌ای را طراحی کردند که در آن از دو روش خشک‌کن پاششی و خشک‌کردن در خلا با دمای متوسط ۴۵ درجه سانتی‌گراد استفاده می‌شد. نتایج نشان داد که پروسه خشک کردن دو مرحله‌ای، زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در مواد غذایی را افزایش می‌دهد. از طرفی در مقایسه با خشک‌کردن انجمادی، سه برابر ارزان‌تر است (۲۵).

۲-۷- خشک‌کردن انجمادی پاششی Spray Freeze drying

در این تکنیک، پروبیوتیک‌ها به‌صورت سوسپانسه‌شده و جدا از هم به یک محلول سرد کننده مانند نیتروژن مایع وارد می‌شوند. این امر منجر به تولید قطرات ریز فریز شده می‌شود که در ادامه منتقل به فریز درایر شده و خشک می‌شوند (۲۶). مزیت این روش عبارت‌اند از امکان کنترل اندازه ذرات، ایجاد سطح بزرگ‌تر در مقایسه با روش خشک‌کن پاششی و لایه‌پوشانی بیشتر کپسول‌ها که سبب افزایش بیشتر محافظت در برابر شرایط محیطی می‌شود (۲۷). از معایب این تکنیک می‌توان به مصرف بالای انرژی، مدت‌زمان طولانی و ۳۰ تا ۵۰ برابر گران‌تر بودن نسبت به خشک‌کن پاششی، اشاره کرد (۲۸). Semyonov و همکارانش (۲۰۱۰) از مالتودکسترین که از ترکیبات ماتریکس دیواره سلولی است و سبب کاهش حرکت سلول‌ها می‌شود و هم‌چنین از ترهالوز به‌عنوان یک ترکیب محافظت‌کننده، استفاده کردند. این ترکیبات قادرند زنده‌مانی باکتری‌ها را طی فرآیندهایی مانند فریز کردن و خشک‌کردن انجمادی حفظ کنند. بطوری‌که ترهالوز قادر است اتصالات هیدروژنی بین پروتئین‌ها و گروه‌های قطبی غشای چربی سلول‌ها ایجاد کرده و مانع آسیب‌دیدن ساختار سلولی هنگام دهیدراتاسیون شود. نویسنده نشان داده که این تکنیک روش مناسبی جهت تولید ریز پوشینه‌های حاوی لاکتوباسیلوس پاراکازئی *Lactobacillus paracasei* با در صد زنده‌مانی بالا در طول مراحل منجمد کردن و خشک‌کردن است (۲۷).

۲-۸- اسپری چیلینگ Spray chilling

این تکنیک تحت عنوان سردکردن پاششی و انجماد پاششی نیز مطرح است و بسیار شبیه خشک‌کن پاششی است. این تکنیک مبتنی بر تزریق هوای سرد است که منجر به جامد شدن ذرات می‌شود. بطوری‌که ابتدا یک محلول مایع که حاوی ترکیبات زنده است آماده شده، سپس هنگام پاشیدن و تماس با هوای سرد به‌سرعت جامد می‌شود (۲۹). در این تکنیک بیشتر از حامل‌هایی با بستر چربی استفاده می‌شود و ارزان‌ترین روش پوشینه‌دار کردن است. از طرفی برای تولید پوشینه‌های کوچک‌تر که در فرآوری غذایی مناسب است، استفاده می‌شود (۳۰). از معایب این تکنیک می‌توان به ظرفیت پایین پوشینه‌دارکردن و ترکیدن هسته مواد، طی زمان ذخیره و نگهداری اشاره کرد. Pedroso و همکاران (۲۰۱۲) از این تکنیک جهت ریزپوشانی بیفیدوباکتریوم لاکتیس *Bifidobacterium lactic* و لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس با استفاده از ترکیبات دیواره و پالم، استفاده کردند. میکروذرات چربی جامد در حفاظت پروبیوتیک‌ها در مسیر عبوری دستگاه گوارش و شیره‌های گوارشی موثر بوده از طرفی قابلیت نگهداری در دماهای پایین را نیز داشتند

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.2.7]

(۳۱).

۲-۹- خشک‌کن پاششی فراصوت تحت خلا Ultrasonic vacuum spray dryer

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

۲-۱۰- سیستم هیبریدی Hybridisation system

یک نوع سیستم پوشینه‌دارکردن 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 می‌شود که بیشترین تماس را با جریان هوای تولید شده توسط چرخش پره‌ها با سرعت بالا دارد. در طول پروسه به‌طور منظم ذرات جدید (مهمان) از متصل شدن به سطح ذرات قدیمی (میزبان) حاصل می‌شوند. طی این سیستم و هنگام تشکیل ریز پوشینه‌ها مقداری حرارت ایجاد می‌شود که ممکن است به باکتری‌ها آسیب بزند. لذا سیستم سردکننده‌ای تعبیه شده است که دما را به زیر ۳۰ درجه سانتی‌گراد می‌رساند (۳۳). از این روش و برخی ترکیبات پری‌بیوتیکی مانند سوربیتول، مانیتول، لاکتوز، زایلیتول، اینولین، فروکتوالیگوساکارید و رافینوز به منظور ریزپوشانی مضاعف پروبیوتیک‌ها استفاده شد و نتایج مثبت قابل‌توجهی ارائه شد (۳۴).

۲-۱۱- تکنیک اتصال و پیوند آئروسل‌ها Impinging aerosol technology

در این روش از پیوند زدن آئروسل‌های جدا از هم استفاده می‌شود. یکی شامل سوسپانسیون میکروبی تهیه شده در آلژینات و دیگری تهیه شده در کلرید کلسیم بطوری‌که مخلوط آلژینات از بالای محفظه و کلرید کلسیم از پائین آن تزریق می‌شود. در این روش ریزپوشینه‌های آلژینات با ابعاد کمتر از ۴۰ میکرومتر تولید می‌شوند (۳۵). به‌دلیل این‌که در این روش از هیچ‌گونه حرارت و حلالی استفاده نمی‌شود، می‌تواند جهت پوشینه‌دار کردن ترکیبات حساس به حرارت و حلال استفاده شود. سهیلی و همکاران (۲۰۱۲) در تحقیقی نشان دادند که ریزپوشانی باکتری‌های زنده‌ی لاکتوباسیلوس رامنسوس *Lactobacillus* GG *rhamnosus* و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس NCFM با این روش، آن‌ها را قادر می‌کند در آب پرتقال با دمای ۲۵ درجه به مدت ۹ روز و در دمای ۴ درجه به مدت ۳۵ روز زنده بمانند (۳۶).

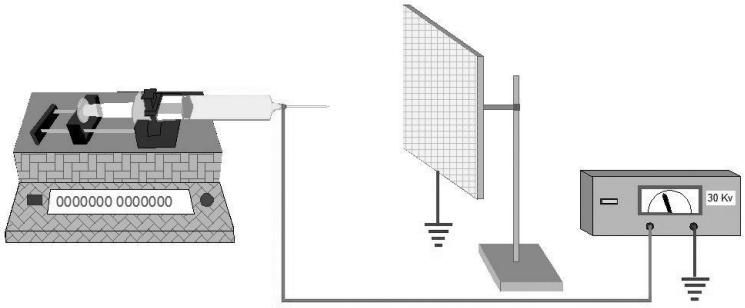
۲-۱۲- الکتروریسی Electrospinning

الکتروریسی فرآیندی ساده‌ای است. محلول یا مذاب پلیمری با نرخ جریان مناسب و بهینه از سوزن باریک سرنگی خارج می‌شود. سوزن یا نازل هم‌زمان الکترود 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 می‌کند. میدان الکتریکی بین نوک سوزن و کلکتور

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.2.7]

باعث کشیدن قطره محلول پلیمری و تغییر شکل آن بر اساس نیروهای الکترواستاتیکی می‌شود. این باعث تغییر شکل قطره نیمه‌کروی به یک‌شکل قیفی می‌شود که قیف تیلور نامیده می‌شود. در زمان رسیدن به ولتاژ مناسب، بارهای سطحی قطره بر کشش سطحی غلبه می‌کند و یک الیاف کشیده شده به سمت جمع کننده تولید می‌کند و بار الکتریکی جریان را به هدف متصل به زمین شتاب می‌دهد (شکل ۲).



شکل ۲- نمایی از ابزار مورداستفاده در تکنیک الکتروریسی

مزیت این تکنیک تولید فیبرها یا کپسول‌های بسیار نازک در حد چند نانومتر با سطح وسیع است. از طرفی امکان تولید زیاد به همراه سادگی این روش سبب کاربردهای مختلف آن شده است (۳۷). جهت ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها با استفاده از این روش از بسترهای پروتئینی (آب‌پنیر تغلیظ شده) و کربوهیدراتی (جوانه‌ها) استفاده می‌شود. در ریز پوشانی پروبیوتیک‌ها با پروتئین‌های آب‌پنیر درصد زنده‌مانی در مقایسه با کربوهیدرات جوانه‌ها بیشتر است (۳۸).

۳- نانوپوشش‌دهی

نکته‌ای که در ابتدا باید به آن اشاره کرد این است که آیا می‌توان پروبیوتیک‌ها را که در ابعاد میکرو هستند در پوشش‌هایی با ابعاد نانو قرارداد؟ جهت پاسخ‌گویی به این سوال توجه به این نکته ضروری است که نانو ذرات دو نوع هستند. یکی از آن‌ها به‌صورت نانو ذرات منفرد و تکی و دیگری متشکل از کمپلکس یا پلیمری از نانو ذرات تکی هستند. مورد اول قطعا قابلیت ریزپوشانی‌پروبیوتیک‌ها را ندارند، ولی نوع دوم این توانائی را دارا است. امروزه بیشتر از ریز پوشانی در ابعاد میکرو استفاده می‌شود، اما کارهایی هرچند اندک با استفاده از تکنیک نانو نیز انجام شده است، که در حال گسترش است. در ادامه به برخی از کارهای انجام شده اشاره می‌شود. نانو لایه‌های خودآراlayer-by-layer self-assembly Electrostatic تکنیک متداول و جدیدی جهت ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها در ابعاد نانو است. در این تکنیک، ابتدا مولکول‌های شیمیایی هدف، لایه‌ای با ضخامت کمتر از نانومتر را روی سطح مورد نظر (باکتری) تشکیل داده، سپس نانولایه‌های بعدی به این لایه اضافه شده و بر روی یکدیگر قرار می‌گیرند. استفاده از جاذبه‌ی الکترواستاتیک یکی از روش‌های موجود جهت پوشش‌دهی سطح موردنظر با نانو لایه‌های خودآرا است.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.2.7]

فرآیند خودآرایی به‌واسطه در معرض قرار گرفتن سطحی باردار در برابر محلولی از پلی‌الکترولیت با شارژ مخالف، آغاز می‌شود. میزان ماده جذب شده به‌واسطه دانسیته بار قابل‌کنترل بوده و به‌صورت خود محدود شونده است. در شرایط مناسب یون‌های متعدد جذب‌شده با عدد استوکیومتری بیشتر از بار نسبی، جذب سطح شده و باعث تغییر علامت بار موجود روی سطح می‌شوند. به همین ترتیب هنگامی‌که سطح در معرض محلول دوم که شامل پلی یون‌ها با بار مخالف است قرار می‌گیرد، لایه‌ای دیگر با بار مخالف روی لایه‌ی قبلی تشکیل می‌شود و تکرار این عمل با تغییر جذب پلی‌آنیون و پلی‌کاتیون، باعث رشد تدریجی نانو لایه‌ها با ضخامت موردنظر می‌شود. در این تکنیک امکان کنترل دقیق ضخامت، یکنواختی و توالی نانولایه‌ها ممکن است. Franz و همکاران (۲۰۱۰) توانستند با استفاده از تکنیک نانو لایه‌های خودآرای الکترواستاتیک-Electrostatic layer by-layer (LbL) nanoselfassembly سویه‌های مختلف باکتریایی مانند *اشرشیاکلی* و مخمری مانند *آرکسولا ادنینیوورانس* ۳ LS *Arxula adeninivorans* ۳*LS* را بدون از دست دادن فعالیت متابولیکی نانوریز پوشانی کنند. بطوری‌که افزایش لایه‌های پلی‌مریک 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 کربوکسی‌متیل‌سلولزCMC بکار بردند. بررسی‌های آن‌ها محافظت بسیار خوب باکتری را در برابر شیره‌های گوارشی نشان داد. قرارگیری باکتری محافظت نشده در شرایط سیستم گوارشی به مدت ۲ ساعت، سبب مرگ کامل آن شد. درصورتی‌که باکتری پوشش داده شده با ۳ نانو لایه (کیتوزان/ کربوکسی‌متیل‌سلولز/ کیتوزان) باعث حفظ ٪۳۳ از باکتری‌ها به‌صورت زنده در همان شرایط شد (۴۰) تکنیک الکتروریسی Electrospinning نوع دیگری است که به‌منظور نانوریزپوشانی پروبیوتیک‌ها موردتوجه و استفاده است. اولین بار که این روش بدین منظور به‌کاربرده شد، توسط Fung و همکارانش (۲۰۱۱) بود بطوری‌که توانستند با استفاده از این روش نانوفیبرهایی از روغن پالم و سویا تهیه کرده و جهت پوشش‌دهی لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس بکار گیرند (۴۱).

پور جعفر و همکاران (۱۳۹۵) توانستند با استفاده از تکنیک ضد حلال فوق‌بحرانی Supercritical Antisolvent Technique (SAS)، ماده اودوراژیت ۱۰۰S را در ابعاد نانو، تولید کرده و به‌عنوان لایه سوم پوشش‌دهی، به همراه دو ترکیب آلژینات‌کلسیم و کیتوزان جهت ریزپوشانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بکار گیرند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ریزپوشانی و پوشینه‌سازی با آلژینات‌کلسیم-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 باکتری‌های ریزپوشانی شده در تمام شرایط، به طور معنی‌داری بالاتر از باکتری‌های آزاد بود .

۴- نتیجه‌گیری

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.2.7]

تکنیک ریزپوشانی یکی از موثرترین روش‌ها جهت حفظ زنده‌مانی و پایداری پروبیوتیک‌ها است و می‌تواند محافظی در برابر پروسه‌های فرآوری مواد غذایی و ذخیره‌سازی باشد. علاوه بر پلی‌ساکاریدها که به‌صورت سنتی در ریزپوشانی استفاده می‌شود، مواد و فناوری‌های جدیدی نیز مانند الکتروریسی و استفاده از ترکیبات پوشش‌دهنده در حد میکرومتر و نانومتر نیز گسترش‌یافته است. اما نیاز به توسعه در این حوزه همواره احساس می‌شود. تحقیقات بیشتر به‌منظور دستیابی به حامل‌های مناسب و سویه‌های باکتریایی در حال انجام است از طرفی، کاهش هزینه‌ها توسط توسعه فناوری‌های آسان‌تر، اثرات سلامت‌بخشی بیشتر و ترکیبات باکتریایی کم‌هزینه‌تر نیز باید مدنظر محققین حوزه نانو و فناوری مواد غذایی قرار گیرد.

فهرست منابع

References

۱- پورجعفر ه، نوری ن، نصرآبادی گ، بستی آ.(۲۰۱۶). مطالعه نقش حفاظتی دانک‌های دوپوشین‌های آلژینات کلسیم- کیتوزان-نانوذرات اودوراژیت S100 حاصل از ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به عنوان فلور غالب روده انسان و حیوانات.مجله تحقیقات دامپزشکی 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 Probioticsas 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) Ecologiacal 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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.2.7]

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-carrageenanlocust bean gum gel. Applied Microbiol ogy 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-Salihu 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, & Ledeboer, 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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.2.7]

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, Shimoni 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 Pedroso 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, Shimoni 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.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.2.7]

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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.2.7]