

## 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

(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 باکتروفاژها و

### 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

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 ریز پوشانی عبارت‌اند از آلزینات کلسیم که به طور گسترده در ریز پوشانی 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 آب پنیر:** پروتئین آب پنیر 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 آب پنیر را جهت ریز پوشانی برخی

افزایش ماندگاری آن‌ها طی پروسه خشک‌کردن انجمادی (۵). در حال حاضر، روش‌های زیادی جهت ریز پوشانی 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 ریز پوشانی شده قبل از رسیدن به دست مصرف‌کننده، انتخاب روش ریز پوشانی و نوع مکانیسم رهاسازی پروبیوتیک‌ها، اندازه نهایی ذرات بطوری که احساس دهانی نامطلوب در مصرف‌کننده ایجاد نکند و هزینه‌های اعمال شده در قبال اثرات مفید، توجه شود. در ریز پوشانی 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 ریز پوشانی باکتری‌های پروبیوتیک در ابعاد میکرو و نانو مورد بررسی قرار گرفته است.

**تکنیک های مورد استفاده در ریز پوشانی باکتری‌های پروبیوتیک**

۲- میکرو ریز پوشانی Microencapsulation

۱-۲- تکنیک اکستروژن Extrusion technique

این تکنیک به دلیل سهولت کار کردن، هزینه‌های پایین و داشتن درصد بالای زنده‌مانی میکروارگانیزم‌ها، 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،

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

(به‌عنوان فاز پيوسته يا فراگير) مانند روغن سويا، ذرت، آفتابگردان اضافه مي‌شود. روش امولسيون به‌طور موفقيت‌آمیزی در ريزپوشاني باكتري‌هاي اسيدلاكتيك بكار مي‌رود. اين روش به‌مراتب ساده‌تر بوده، ولي به دليل استفاده از روغن گياهي براي ساخت امولسيون نسبت به روش اكستروژن هزينه بالاتري را مي‌طلبد. در اين روش، در ادامه مخلوط حاصل از طريق هم‌زدن به‌خوبي همگن مي‌شود تا امولسيون به دست آيد. زماني كه امولسيون آب در روغن تشكيل شد، پليمر محلول (در اثر واكنش‌هاي نامتقاطع) نامحلول شده و ذراتي را در فاز روغني ايجاد مي‌كند (۱۲). در ادامه ميكروذرات با فيلتراسيون جدا مي‌شود. اندازه ذرات به‌سرعت هم‌زدن بستگي دارد و عموماً بين ۲ ميلي‌متر تا ۲۵ ميكرون است. مهم‌ترين تركيباتي كه به‌منظور ريزپوشاني پروبيوتيك ها با استفاده از اين تكنيك استفاده شده است عبارتند از كاراگينان Carrageenan و مخلوط‌هاي آن (۱۳) و (۱۴)، سدیم كربوكسي متيل سلولز Sodium CarboxyMethyl Cellulose (NaCMC) (۱۵)، سلولز استات‌فتالات Cellulose Acetate Phthalate (CAP)، كيتوزان Chitosan (۱۶)، ژلاتين (۱۷)، پروتئين نخود Chickpea protein (۱۸).

### ۲-۳- تكنيك بسترسيال Fluid bed

در اين سيستم، سوسپانسيون سلولي به درون محفظه‌هايي كه جريان مايعی برقرار است، پاشيده و خشك مي‌شود. مزيت اين روش، امکان كنترل كامل دما و هزينه‌هاي پايين و عيب آن سخت بودن تكنيك و زمان‌بر بودن آن است. قبل از خشك‌کردن، لازم است كه پروبيوتيك‌ها توسط محيط‌هايي مانند شير خشك Skimmed milk، آلزینات كلسيم يا چربي

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

**پكتين:** پكتين هتروپولي ساكاريدي است كه از ميوه‌ها به دست مي‌آيد و به‌عنوان ژله در موادغذايي استفاده مي‌شود. Gebare و همكارانش در ۲۰۱۳، ميكروذرات پكتيني پوشش داده شده با پروتئين آب‌پنير توليد كردند كه اثر حفاظتي بيشتری بر روی 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 معدي بررسی کرده 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 باكتريايي به‌دست مي‌آيد. Su و همكارانش در سال ۲۰۱۱ ابتدا ميكروذراتي با استفاده از آلزینات و HCL تهيه‌کرده و سپس كلاژن شبه‌انسانی را با تركيب فوق مخلوط كردند. اين امر منجر به افزايش پايداري ميكروذرات (توسط تشكيل باندهاي هيدروژني درون‌مولكولي) و در نتيجه افزايش پايداري و زنده‌ماني پروبيوتيك‌ها در شرايط مشابه دستگاه گوارش شد (۱۱).

۲-۲- تكنيك امولسيون‌سازي Emulsion technique در روش امولسيون‌سازي حجم كمی از سلول يا پليمر (به‌عنوان فاز پراكنده) به حجم زيادی از روغن گياهي

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

خشک‌کردن پاششی معمول‌ترین و قدیمی‌ترین روش جهت ریزپوشانی مواد غذایی است. همچنین برای مولکول‌های غذایی فعال و هم برای پروبیوتیک‌های زنده به کار می‌رود. خشک‌کردن پاششی فرآیندی ارزان و سریع است و زمانی که به قدر 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، به عنوان مثال در کاربرد برای پروبیوتیک‌های زنده، به دلیل 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. 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

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 شیره‌های گوارشی به عنوان یک عامل پوشش‌دار کردن 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 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 شیره‌های 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- خشک‌کردن انجمادی Freeze Drying

چندین دهه است که این تکنیک برای نگهداری پروبیوتیک‌ها به صورت پودری استفاده می‌شود. ولی تلفیق دو تکنیک ریزپوشانی و لیوفیلیزه 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 آب‌پنیر، گلوکز، مالتودکسترین،

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

به‌كارگيري چنين دماهايي ميزان زنده‌ماني را کاهش 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 خشك‌كردن دو مرحله‌اي، زنده‌ماني پروبيوتيك‌ها در مواد غذايي را افزايش مي‌دهد. از طرفي در مقايسه با خشك‌كردن انجمادي، سه برابر ارزان‌تر است (۲۵).

### ۲-۸- اسپري چيلينگ *Spray chilling*

در اين تكنيك، پروبيوتيك‌ها به‌صورت سوسپانسه‌شده و جدا از هم به يك محلول سرد كننده مانند نيترژن مایع وارد می‌شوند. اين امر منجر به توليد قطرات ريز فریز شده می‌شود كه در ادامه منتقل به فریز درایر شده و خشك می‌شوند (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 می‌شود (۲۷). از معايب اين تكنيك می‌توان به مصرف بالای انرژی، مدت‌زمان طولانی 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 کاهش حركت سلول‌ها می‌شود و هم‌چنين از ترهالوز به‌عنوان يك تركيب محافظت‌كننده، استفاده كردند. اين تركيبات قادرند زنده‌ماني باكتري‌ها را طی فرآيندهايي مانند

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

### ۲-۷- خشك‌كردن انجمادي پاششي *Spray Freeze drying*

در اين تكنيك، پروبيوتيك‌ها به‌صورت سوسپانسه‌شده و جدا از هم به يك محلول سرد كننده مانند نيترژن مایع وارد می‌شوند. اين امر منجر به توليد قطرات ريز فریز شده می‌شود كه در ادامه منتقل به فریز درایر شده و خشك می‌شوند (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 می‌شود (۲۷). از معايب اين تكنيك می‌توان به مصرف بالای انرژی، مدت‌زمان طولانی 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 کاهش حركت سلول‌ها می‌شود و هم‌چنين از ترهالوز به‌عنوان يك تركيب محافظت‌كننده، استفاده كردند. اين تركيبات قادرند زنده‌ماني باكتري‌ها را طی فرآيندهايي مانند

(۳۱).

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

#### ۱۱-۲- تکنیک اتصال و پیوند آئروسول‌ها

##### Impinging aerosol technology

در این روش از پیوند زدن آئروسول‌های جدا از هم استفاده می‌شود. یکی شامل سوسپانسیون میکروبی تهیه شده در آلزینات و دیگری تهیه شده در کلرید کلسیم بطوری‌که مخلوط آلزینات از بالای محفظه و کلرید کلسیم از پائین آن تزریق می‌شود. در این روش ریزپوشینه‌های آلزینات با ابعاد کمتر از ۴۰ میکرومتر تولید می‌شوند (۳۵). به دلیل 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 زنده *Lactobacillus GG* و *rhamnosus* 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).

#### ۱۲-۲- الکتروریسی

الکتروریسی فرآیندی ساده‌ای است. محلول یا مذاب پلیمری با نرخ جریان مناسب و بهینه از سوزن باریک سرنگی خارج می‌شود. سوزن یا نازل هم‌زمان 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 جمع‌کننده فلزی که بلافاصله ۱۰ تا ۲۵ سانتیمتر قرار گرفته است، ایجاد می‌کند. میدان الکتریکی بین نوک سوزن و کلکتور

#### ۹-۲- خشک‌کن پاششی فراصوت تحت

##### Ultrasonic vacuum spray dryer خلا

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).

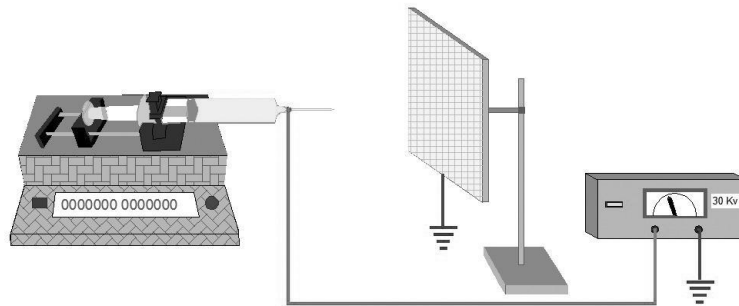
#### ۱۰-۲- سیستم هیبریدی Hybridisation system

یک نوع سیستم پوشینه‌دار 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 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

## "رَجَب زاده شانديز و حسيني نژاد، مروري بر انواع روش‌هاي ميکروريزپوشاني..."

مناسب، بارهاي 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).

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



شکل ۲- نمایی از ابزار مورد استفاده در تکنیک الکتروریسی

پلیمری از نانو ذرات تکی هستند. مورد اول قطعا قابلیت ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها 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 خودآرا layer-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 مورد نظر با نانو لایه‌های خودآرا است.

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 به صورت نانو ذرات منفرد و تکی و دیگری متشکل از کمپلکس یا

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 باکتری‌ها به صورت زنده در همان شرایط شد (۴۰) تکنیک الکترورسی Electrospinning نوع دیگری است که به منظور نانوریزپوشانی پروبیوتیک‌ها 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 آلزینات کلسیم و کیتوزان جهت ریزپوشانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بکار گیرند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ریزپوشانی و پوشینه سازی با آلزینات کلسیم-کیتوزان- اودوراژیت نقش موثری در حفاظت از باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس تحت شرایط محلول اسید هیدروکلریک، محلول بافر فسفات و محلول حاوی پودر دایجستو با و بدون تنش مکانیکی ایفا کرده و میزان بقای باکتری‌های ریزپوشانی شده در تمام شرایط، به طور معنی داری بالاتر از باکتری‌های آزاد بود.

#### ۴- نتیجه گیری

فرآیند خودآرایی به واسطه در معرض قرار گرفتن سطحی باردار در برابر محلولی از پلی‌الکترولیت با شارژ مخالف، آغاز می‌شود. میزان ماده جذب شده به واسطه دانسیته بار قابل کنترل بوده و به صورت خود محدود شونده است. در شرایط مناسب یون‌های متعدد جذب شده با عدد استوکیومتری بیشتر از بار نسبی، جذب سطح شده و باعث تغییر علامت بار موجود روی سطح می‌شوند. به همین ترتیب هنگامی که 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 مورد نظر می‌شود. در این تکنیک امکان کنترل دقیق ضخامت، یکنواختی و توالی نانو لایه‌ها ممکن است. Franz و همکاران (۲۰۱۰) توانستند با استفاده از تکنیک نانو لایه‌های خودآرایی الکترواستاتیک-Electrostatic layer nanoselfassembly (LbL) by-layer سویه‌های مختلف باکتریایی مانند اشرشیاکلی و مخمری مانند آرکسولا ادنینیورانس *Arxula adeninivorans* ۳ را بدون از دست دادن فعالیت متابولیکی نانوریز پوشانی کنند. بطوری که 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 کربوکسی متیل سلولز CMC بکار بردند. بررسی‌های آن‌ها محافظت بسیار خوب باکتری را در برابر شیرهای گوارشی نشان داد. قرارگیری



## "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 گسترش يافته است. اما نياز به توسعه در

### References

### فهرست منابع

- 1- پورجعفر، ه، نوري ن، نصرآبادي گ، بستي آ. (۲۰۱۶). مطالعه نقش حفاظتي دانك‌هاي دويوشين‌هاي آلژينات كلسيم- كيتوزان-نانوذرات اودوراژيت S100 حاصل از ريزپوشاني باكتري لاکتوباسيلوس 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- $\kappa$ -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  $\kappa$ -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-Salih M, Mueller M, Salar-Behzadi S, Unger FM, Viernstein H (2014)** Effect of lyoprotectants on  $\beta$ -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*

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, Liang 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 1 $\mu$ m to 1000 $\mu$ m 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