ارزیابی زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی درون پوشانی شده با آلژینات سدیم و سیلیس

فرزانه ضیائیان یزدی نژاد[۱]، مسعود نجف نجفی[۲*]، محبوبه سرابی[۳]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، کارشناس ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان، قوچان، ایران.

*۲- دانشیار گروه صنایع غذایی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.

۳- گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۹٦/۰٤/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹٦/۰۷/۱)

چکیده

درون‌پوشانی یکی از مؤثرترین روش‌های افزایش قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک است. در این مطالعه امکان استفاده از پوشش آلژینات-سیلیس به منظور درون‌پوشانی لاکتوباسیلوس کازئی مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، فرآیند درون‌پوشانی با آلژینات سدیم ۱/۵ درصد وسه سطح مختلف از سیلیس (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد حجمی/ حجمی) با روش اکستروژن انجام شد. زنده‌مانی باکتری‌های آزاد و درون‌پوشانی شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد طی ۲۸ روز بررسی گردید. واکنش شیمیایی و ایجاد پیوند میان ژل آلژینات و سیلیس بوسیله طیف سنجی FT-IR تأیید شد. با اضافه شدن سیلیس، اندازه کپسول‌ها افزایش یافت ولی تأثیری بر راندمان درون پوشانی نداشت (p<۰/۰۵). نتایج نشان داد تعداد سلول‌های آزاد پس از اتمام زمان نگهداری ۳/۳۲ سیکل لگاریتمی کاهش یافت، درحالی‌که این کاهش برای باکتری‌های درون‌پوشانی شده یه شکل معنی‌داری کمتر بود. اختلاف معنی داری بین نمونه‌های آلژینات و آلژینات با ۵ درصد سیلیس در قابلیت زنده‌مانی باکتری در مدت زمان ١٤ روز مشاهده نگردید. با افزایش غلظت سیلیس، تعداد باکتری های زنده در طی دوران نگهداری کاهش یافت.

کلید واژگان: پروبیوتیک، ریزپوشانی، سیلیس، آلژینات، لاکتوباسیلوس کازئی.

*مسئول مکاتبات: mnajafi.mhd@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-19]

۱- مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که اگر به تعداد کافی و به صورت زنده به روده برسند، اثرات سلامتی‌بخش مانند تحریک سیستم ایمنی، کاهش کلسترول خون، خصوصیات ضدسرطانی و ضدجهش‌زایی، ضدعفونت،کاهش عدم تحمل لاکتوز و افزایش ارزش تغذیه ای بر میزبان بر جای می‌گذارند [۱]. بر حسب استانداردها، برای بروز این اثرات سلامتی‌بخش، باید حداقل $۱۰^{۶}$ تا $۱۰^{۷}$ باکتری پروبیوتیک در هر گرم محصول وجود داشته باشد [۲]. به منظور بهبود زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها و کاهش اثرات تخریبی ناشی از تغییرات pH، تنش‌های مکانیکی، شرایط تولید مواد غذایی و شرایط اسیدی-صفراوی دستگاه گوارش، از فرایند درون‌پوشانی[1] استفاده می‌شود [۳]. مطالعات زیادی در رابطه با درون‌پوشانی پروبیوتیک‌ها با استفاده از ترکیبات گوناگون نظیر زانتان [٤]، ژلاتین [٥]، کاراگینان [٦] صورت گرفته است، اما در این میان، آلژینات به میزان گسترده‌ای در فرآیند درون‌پوشانی استفاده شده است [۷]. این ماده از جلبک‌های دریایی استخراج شده و با کلرید کلسیم ساختار مستحکمی را بوجود می‌آورد [۳]. علت استفاده از آن ارزانی، سهولت کاربرد، سمی نبودن، فناوری آسان و مطابقت و سازگاری با محیط زیست می‌باشد و به عنوان افزودنی مجاز غذایی نیز شناخته شده است [۸]. کپسول‌های آلژینات را می‌توان با روش‌های امولسیون و اکستروژن تهیه نمود [۷]. اندازه کپسول‌ها بسته به نوع مواد دیواره و تکنولوژی تولید، می‌تواند از میکرومتر تا چند میلی‌متر متغیر باشد [۹]. دیواره این کپسول‌ها نیمه تراوا می‌باشد، بنابراین به متابولیت‌ها اجازه عبور می‌دهد اما از خروج سلول‌های باکتریایی جلوگیری می‌کند اما با وجود این مزایا، مشخص شده است که کپسول‌های آلژینات به شرایط اسیدی حساس هستند و استحکام مکانیکی خوبی ندارند و ساختار متخلخل آن اجازه می‌دهد تا اسید براحتی به داخل کپسول نفوذ نماید [۲]. برای رفع این مشکل، محققین تلاش کرده‌اند تا یک لایه اضافی از ترکیبات مختلف بر روی آلژینات قرار دهند [۳]. به‌همین‌منظور، تلاش‌هایی در جهت تهیه کپسول‌های آلژینات-نشاسته [۱۰]، آلژینات-گلیسرول [۱۱]، آلژینات-کیتوزان [۱۲] و آلژینات-پروتئین آب پنیر [۱۳] گزارش شده است و تحقیقات برای معرفی مواد جدید با خصوصیات مطلوب‌تر ادامه دارد. دراین‌میان، سیلیس یکی از موادی است که به دلیل زیست سازگاری خوب (در شکل آمورف از طرف FDA[2] بعنوان GRASS[3] شناخته شده است)[١٤]، مقاوت مکانیکی مطلوب در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی و نفوذ ناپذیری بالا در درون‌پوشانی مولکول‌های زیستی مورد توجه زیادی قرار گرفته است [۱۵ و ۱٦]. عمده محققین تاکنون سعی خود را معطوف به تثبیت تعدادی از آنزیم‌ها و داروها بر روی سیلیس نموده‌اند و گزارشات محدودی در خصوص استفاده از این ترکیب به منظور درون-پوشانی باکتری‌ها منتشر شده است. طی تحقیقی در سال ۲۰۰۷ از دی‌اکسیدسیلیس و سیلیکات سدیم جهت تثبیت باکتری‌های *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* استفاده شد. آن‌ها باکتری‌های تثبیت شده را در دمای ٤، ۲۰، ۲۰- و ۷۰- سانتی گراد نگه‌داری کردند و زنده‌مانی سلول‌ها را طی چهار ماه بررسی کردند. نتایج، ۵-۳ سیکل لگاریتمی برای *E.coli* و ۷-۵ سیکل لگاریتمی برای *S. aureus* کاهش نشان داد [۱۷]. کورادین و همکاران (۲۰۰۷) توانمندی سیلیس در درون‌پوشانی ترکیبات مؤثره و مقامت آن‌را در تنش‌های محیطی در ترکیب با آلژینات مورد بررسی قرار داده و عنوان کردند که از سیلیس می‌توان برای تولید کپسول‌هایی با مقامت بالا استفاده نمود [۱۸]. هیو و همکاران (۲۰۱٤) از ترکیب آلژینات با سیلیس به عنوان حامل داروی ایندومتاسین استفاده کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که این ترکیب در مقایسه با آلژینات به‌تنهایی توانست دارو را بخوبی محافظت نماید و رهایش در شرایط کنترل شده اتفاق افتاد [۱۹]. موتلو و همکاران (۲۰۱۵) دریافتند که ژل سیلیس می‌تواند بعنوان یک محافظ مناسب در فرایند درون‌پوشانی باکتری‌ها در برابر خشک شدن عمل نماید [۲۰].

لاکتوباسیلوس کازئی جزء پر کاربردترین و مهمترین باکتری-های پروبیوتیک در صنایع غذایی به‌شمار می‌رود. بنابراین بررسی بقاء این باکتری با درون‌پوشانی مناسب و مستحکم به

1 . Microencapsulation

2 .Food and Drug Administration

3. Generally Recognized As Safe

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-19]

منظور استفاده در محصولات غذایی و داروهای پروبیوتیکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. ازسوی‌دیگر تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از سیلیس برای درون‌پوشانی پروبیوتیک‌ها منتشر نشده است. لذا هدف این پژوهش بررسی امکان استفاده از سیلیس با آلژینات در درون‌پوشانی و ارزیابی زنده‌مانی گونه مهم پروبیوتیکی، لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط نگهداری مواد غذایی بود.

۲- مواد و روش‌ها

لاکتوباسیلوس کازئی ATCC 39392 به صورت خالص و لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. آلژینات سدیم از شرکت سیگما آلدریچ، محیط کشت MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) از شرکت مرک آلمان، سیلیس (Fluka, Buchs, Switzerland)، سیترات سدیم و بقیه مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک آلمان تهیه گردیدند.

۲-۱- آماده‌سازی باکتری پروبیوتیک

لاکتوباسیلوس کازئی ATCC 39392 در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوازی به مدت ۲٤ ساعت فعال گردید. سپس نمونه حاصل در ۹۵ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع تلقیح شد و تحت شرایط فوق تکثیر گردید. بیومس حاصله توسط سانتریفیوژ g ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد جداسازی شد و در دو مرحله با محلول استریل ۰/۱ درصد آب پپتونه شستشو گردید [۷]. تعداد سلول‌های پروبیوتیکی سوسپانسیون اولیه تقریبا $10^{8}-10^{9}$ cfu/ml تعیین شد.

۲-۲- تهیه سوسپانسیون کلوئیدی سیلیس

۱ گرم از پودر سیلیس با ٤ میلی لیتر سود ۲ مولار مخلوط و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا سوسپانسیون کلوئیدی کامل حاصل شود [۱۷].

۲-۳- تهیه محلول آلژینات سدیم

۳ گرم از پودر آلژینات سدیم در ۹۷ میلی‌لیتر آب مقطر توسط همزن مغناطیسی حل گردید و به مدت ۲٤ ساعت به منظور جذب کافی آب در دمای یخچال باقی ماند. سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد تا در فرایند درون‌پوشانی مورد استفاده قرار گیرد [۹].

۲-٤- آماده‌سازی ژل آلژینات-سیلیس و فرآیند درون‌پوشانی

pH محلول کلوئیدی سیلیس با استفاده از اسید کلریدریک ۵ نرمال در دامنه حدود ۷ تنظیم گردید. سپس محلول آلژینات ۳ درصد و آب مقطر به محلول کلوئیدی سیلیس اضافه شد و غلظت نهایی آلژینات و سیلیس به ترتیب به ۱/۵ و ۵ ، ۱۰ و ۱۵ درصد رسید [۲۱]. 10^{9} کلنی باکتری پروبیوتیک به ازای هر میلی‌لیتر به این محلول وارد شد. جهت درون‌پوشانی از روش اکستروژن استفاده گردید. بدین ترتیب که سوسپانسیون آلژینات-سیلیس-باکتری حاصل با استفاده از سرنگ استریل با قطر ۰/۲ میلی‌متر به ظرف حاوی محلول ۰/۱ مولار کلرید - کلسیم استریل تزریق شد تا کپسول‌های حاوی لاکتوباسیلوس کازئی تشکیل گردد. کپسول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه برای سفت شدن در محلول فوق نگهداشته شدند. پس از آبکشی، تا زمان مصرف در آب پپتون ۰/۱ درصد استریل در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد باقی ماندند [۲۲].

۲-۵- شمارش تعداد باکتری‌های به‌دام‌افتاده در کپسول‌ها

برای شمارش باکتری‌های به دام افتاده در کپسول‌ها، ۱ گرم از کپسول‌ها را در ۹۹ میلی‌لیتر سیترات سدیم ۲ درصد (وزنی/حجمی) با pH=٦ به مدت ۱۰ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی قرار داده تا به‌طور کامل حل شود. سپس رقت سازی صورت گرفت و در محیط کشت MRS Agar به مدت ٤۸-۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد . این عمل با ۳ تکرار انجام شد و در نهایت کلنی باکتری‌ها شمارش گردید [۲۳].

۲-٦- بررسی شکل و اندازه کپسول‌ها

ابعاد کپسول‌ها با استفاده از میکرومترهای چشمی و مرحله‌ای تعیین شد. برای هر فرمول، ۵۰ عدد کپسول به‌صورت تصادفی برای محاسبه اندازه انتخاب گردیدند. اندازه هر فرمول به صورت میانگین ± انحراف استاندارد ارائه شد [۷].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-19]

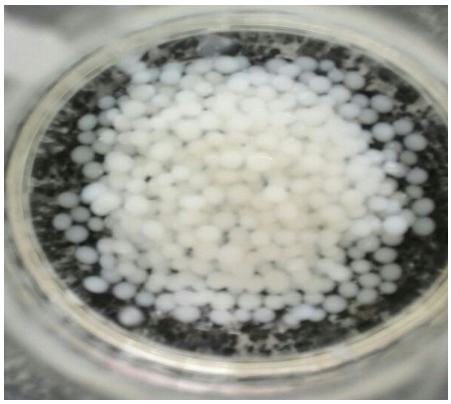

Fig 1 Image of alginate coated with 15% silica.

۲-۷- راندمان درون‌پوشانی

راندمان درون پوشانی (EY)، یعنی تعداد سلول‌های باکتریایی که پس از فرایند و در داخل کپسول‌ها زنده باقی ماندند به صورت زیر محاسبه گردید:

$$EY = (N/N_0) \times 100$$

N_0 تعداد باکتری‌های زنده در محیط کشت (CFU/ml)، N تعداد باکتری‌های زنده در کپسول (CFU/g).

۲-۸- طیف سنجی FT-IR

طیف مادون قرمز نمونه‌های آلژینات و آلژینات-سیلیس با استفاده از دستگاه طیف سنج FT-IR (Shimadzu, Kyoto, Japan) انجام شد. طیف‌های مادون قرمز نمونه‌ها بر مبنای میزان عبور طیف و با وضوح ۱/۹۳ بر سانتی‌متر در محدوده طول موج ٤٠٠ تا ٤٠٠٠ (cm^{-1}) ثبت گردیدند [٢٤].

۲-۹- طرح آماری

آنالیز آماری در این آزمون با استفاده از نرم‌افزار مینی‌تب ١٦ بر پایه طرح کاملا تصادفی در قالب فاکتوریل انجام شد. پس از آنالیز واریانس میانگین‌های مربوطه با آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ مقایسه شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین اندازه و شکل ظـاهری کپســول‌ها

همان‌گونه که نتایج حاصل در جدول ۱ نشان می دهد، اندازه کپسول‌ها با اضافه شدن مقدار سلیس افزایش یافت. میانگین نمونه‌های حاوی آلژینات ١/٥٤ میلی‌متر بود که به طور معنی-داری از سایر کپسول‌های درون‌پوشانی شده، کوچک‌تر است (p<۰/۰۵). نتایج مشابهی توسط سایر محققین مبنی بر تولید کپسول‌های بزرگ آلژینات کلسیم (بزرگ‌تر از یک میلی-متر)گزارش شده است [۲۵ و ٢٦]. کپسول‌های آلژیناتی که با روش اکستروژن تهیه می‌شوند معمولا قطری بین ۰/۵ تا ۳/۵ میلی‌متر دارند[۱۸]. اندازه کپسول‌ها بر روی ظاهر ماده غذایی و قابلیت زنده‌مانی باکتری‌ها تاثیر دارد.گزارش شده است که کپسول‌های بزرگ‌تر از یک میلی‌متر موجب خشن شدن بافت ماده غذایی می‌شوند و کپسول‌های با قطر کمتر از ۱۰۰ میکرون تاثیری در زنده‌مانی باکتری‌ها ندارند و اثر حفاظتی خود را از دست می‌دهند [۱۱]. مشاهدات همچنین بیانگر تشکیل کپسول-های کروی بود و اضافه کردن سیلیس هیچ تأثیری بر شکل آن-ها نداشت (شکل ۱و ۲) و همچنین اختلاف معنی‌داری بین راندمان درون‌پوشانی ملاحظه نگردید (جدول ۱). در تأیید نتایج حاصل از این مطالعه، پژوهشگران متعددی نیز گزارش نموده‌اند که اضافه کردن لایه به پوشش آلژینات دیواره کپسول بر شکل آن تأثیری ندارد [۷، ۹ و ۱۲].

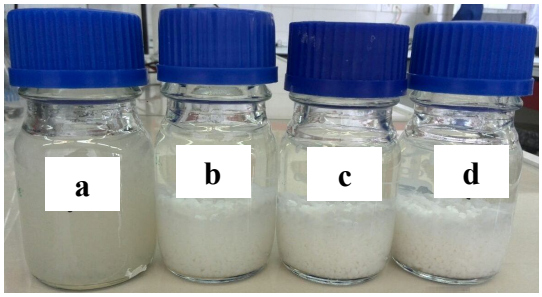

Fig 2 Images of beads (a) alginate without silica, (b) alginate with 5% silica, (c) alginate with 10% silica, (d) alginate with 15% silica.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-19]

Table 1 Size and encapsulation yields of different beads

Beads type	Size of beads (mm)	Microencapsulation yield (%)
Alginate	1.54 ± 0.07	90.61
Alginate + Silica 5%	1.78 ± 0.04	89.97
Alginate + Silica 10%	1.89 ± 0.06	90.03
Alginate + Silica 15%	1.99 ± 0.04	90.33

۳-۲- بررسی تشکیل ژل آلژینات-سیلیس

طیف مادون قرمز FT-IR بدست آمده برای آلژینات و آلژینات-سیلیس در شکل ۳ نشان داده شده است. پیک‌های ظاهر شده در طول موج‌های ۱۶۲۰ و ۱۴۱۶ (cm^{-1}) مربوط به کشش متقارن و نامتقارن گروه کربوکسیل، طول موج ۱۰۳۰ (cm^{-1}) جذب پیوند گروه C-O و جذب پیوند گروه هیدروکسیل در طول موج ۳۴۵۳ (cm^{-1}) در طیف مربوط به آلژینات مشاهده می‌شود. درحالی‌که در طیف آلژینات-سیلیس، پیک‌های جذبی جدیدی در طول موج‌های ۱۶۳۳ و ۱۴۳۵ (cm^{-1}) مربوط به کشش متقارن و نامتقارن گروه کربوکسیل و طول موج ۳۴۴۴ (cm^{-1}) متناسب با جذب پیوند گروه هیدروکسیل مشاهده گردید. ژو و همکاران (۲۰۰۶) نتایج مشابهی را در مورد ژل آلژینات-سیلیس گزارش کردند [۲۴]. این مطلب مبین تشکیل پیوند هیدروژنی بین گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل آلژینات با گروه هیدروکسیل سیلیس می‌باشد. به‌طورکلی، سیلیس در pH=7 به شکل اسید سیلیسیک ($Si(OH)_4$) وجود دارد. بااین‌حال، به‌دلیل‌این‌که الیگومرهای سیلیس در طول فرآیند پلیمریزاسیون تشکیل می‌شوند، گروه‌های سیلانول آن‌ها (Si-OH) به‌طور اسیدی افزایش می‌یابند تا بار منفی را تحمل کنند. ازآن‌جاکه آلژینات نیز در این pH منفی است، هیچ تعاملی از نوع جاذبه الکترواستاتیک بین این دو ترکیب وجود ندارد. بنابراین همان‌طور که طیف‌های حاصل از FT-IR نشان داد (شکل ۳)، پیوند هیدروژنی بین زنجیره پلی‌ساکارید (آلژینات) و گروه‌های سیلانول (سیلیس) تشکیل شده است.

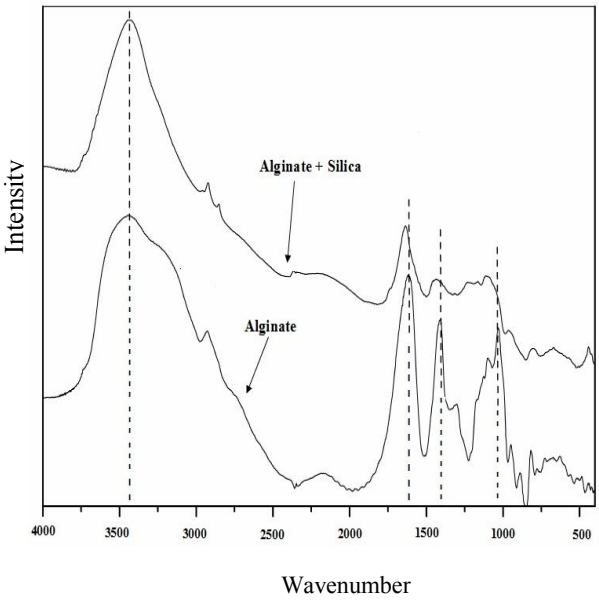

Fig 3 FT-IR spectrum of alginate-silica and alginate gel beads.

۳-۳- بررسی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کازئی آزاد و درون پوشانی شده

همان‌طورکه قبلا عنوان گردید هدف اصلی این پژوهش، بررسی امکان استفاده از سیلیس بعنوان یک لایه اضافی بر پوشش آلژینات و استفاده در درون‌پوشانی لاکتوباسیلوس کازئی بود. نتایج جدول ۲ نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تعداد باکتری های زنده آزاد و درون‌پوشانی شده پس از بیست‌وهشت روز نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد وجود داشت (p<۰/۰۵). باکتری‌های آزاد بیشترین زنده‌مانی را در روز اول با میانگین ۸/۱۳ و کمترین زنده‌مانی را در روز بیست‌وهشتم با میانگین ٤/۸۱ سیکل لگاریتمی داشتند یعنی در پایان دوره نگهداری، ۳/۳۲ سیکل لگاریتمی از جمعیت سلول‌های آزاد کاسته شد که با نتایج تحقیقات همایونی و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-19]

آن‌ها گزارش کردند تعداد سلول‌های لاکتوباسیلوس کازئی در حالت آزاد طی هشتاد روز نگه‌داری در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد حدود ۳/٤ سیکل لگاریتمی کاهش یافت [۲۷].

Table 2 Average number (mean) of survived cells of free and microencapsulated cells of *L. casei* ATCC 39392 after storage at 4°C (n = 3).

Composition of beads	Storage times (day)					
	Initial stages	3	7	14	21	28
Free cell	8.13 ± 0.13	8.07 ± 0.13	6.85 ± 0.02	6.78 ± 0.01	5.68 ± 0.01	4.81 ± 0.06
Alginate	8.12 ± 0.11	8.05 ± 0.05	8.01 ± 0.05	8.14 ± 0.04	8.04 ± 0.07	7.85 ± 0.03
Alginate + Silica 5%	8.10 ± 0.27	8.10 ± 0.03	8.09 ± 0.04	8.05 ± 0.07	7.28 ± 0.02	6.85 ± 0.05
Alginate + Silica 10%	8.11 ± 0.02	8.01 ± 0.02	8.04 ± 0.04	7.23 ± 0.01	5.08 ± 0.04	4.58 ± 0.02
Alginate + Silica 15%	8.13 ± 0.03	8.05 ± 0.04	7.65 ± 0.06	5.78 ± 0.01	4.45 ± 0.03	2.89 ± 0.04

تا روز هفتم تفاوت معنی‌داری بین باکتری های درون‌پوشانی شده با آلژینات و آلژینات با غلظت‌های ۵ و ۱۰ درصد سیلیس مشاهده نشد ($p<۰/۰۵$) و حتی به‌نظرمی‌رسد نمونه حاوی ۵ درصد سیلیس به نحو مطلوب‌تری باکتری پروبیوتیک را محافظت نموده است. اما در روز چهاردهم، این روند فقط برای کپسول های حاوی آلژینات و آلژینات با ۵ درصد سیلیس ادامه یافت. یعنی باکتری‌های زنده درون کپسول‌های حاوی آلژینات و ۱۰ و ۱۵ درصد سیلیس در روزهای۱٤، ۲۱ و ۲۸ به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کردند ($p<۰/۰۵$). نمونه آلژینات با ۱۵ درصد سیلیس در روز بیست‌وهشتم با دارا بودن میانگین ۲/۸۹ سیکل لگاریتمی، کمترین میزان سلول زنده را در بین کلیه نمونه‌های درون‌پوشانی شده داشت. علت این امر می تواند غلظت بالای سیلیس و در نتجه بستن تمامی خلل و فرج و راه‌های انتقال مواد غذایی به داخل کپسول باشد. هافنر و همکاران (۲۰۱٦) دریافتند که با افزایش غلظت سیلیس در پوشش آلژینات–سیلیس، تعداد باکتری های درون‌پوشانی شده به شکل معنی‌داری کاهش یافت که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [۲۹]. دپریسکو و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش کردند تعداد باکتری‌های پروبیوتیک زنده درون پوشانی شده، پس از ۲۸ روز کاهش پیدا کرد. این باکتری‌ها که به شکل مرطوب و در محلول کلرید کلسیم نگه‌داری شده بودند به میزان ۳ سیکل لگاریتمی کاهش یافتند درحالی‌که این میزان برای باکتری‌های آزاد ٤/۵ سیکل لگاریتمی بود [۳۰]. در تحقیق دیگری، تعداد با کتری های آزاد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* کاهش یافت و در پایان ۱۰ روز نگهداری، این کاهش به میزان ۵ سیکل لگاریتمی گزارش گردید. در حالی که این کاهش در نمونه های غنی شده با اینولین در پایان ۹۰ روز دوره نگهداری به مراتب کمتر بود [۳۱]. خسروی زنجانی و همکاران (۱۳۹۲) اظهار کردند لاکتوباسیلوس کازئی به صورت آزاد و درون‌پوشانی شده پس از ٤۰ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد از تعداد اولیه ۵×۱۰^{۱۱} به ترتیب به ٤×۱۰^{۳} و ٦×۱۰^{۷} رسید. این محققان اعلام کردند با مقایسه زنده‌مانی بین ۱۰ تا ٤۰ روز از زمان نگه داری، تفاوت معنی‌داری بین لاکتوباسیلوس کازئی آزاد و درون‌پوشانی شده مشاهده شد. بعلاوه سلول‌های درون‌پوشانی شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به زمان طولانی‌تری برای کاهش یک سیکل لگاریتمی نیاز داشتند؛ اما سلول‌های آزاد کاهش ناگهانی شدیدی در سیکل لگاریتمی خود نشان دادند. این کاهش برای سلول های درون‌پوشانی شده حدود ٤ سیکل لگاریتمی بود و با نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده در این پژوهش مطابقت داشت. همچنین نتایج جدول ۲ مبین آن است که کپسول‌های با پوشش آلژینات بیشترین و کمترین میزان باکتری را در روز اول و بیست‌وهشتم با میانگین ۸/۱۲ و ۷/۸۵ سیکل لگاریتمی داشتند و طی گذشت زمان ماندگاری ۰/۳۷ سیکل لگاریتمی از تعداد باکتری ها کاسته شد. این نتایج با گزارش زاچیا ایوب و همکاران (۲۰۱٦) مطابقت دارد. این محققین زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-19]

پلانتاروم را درون سوسپانسیون آلژینات، آلژینات و پکتین و به صورت آزاد بررسی کردند. آن‌ها متوجه شدند تعداد باکتری-های پوشش داده شده با آلژینات پس از بیست‌ویک روز تنها یک سیکل لگاریتمی کاهش یافت؛ درحالی‌که این کاهش برای باکتری‌های درون آلژینات و پکتین حدود دو سیکل لگاریتمی بود و پوشش آلژینات به تنهایی بهتر از باکتری‌ها محافظت کرد [۲۸]. جیباسی و همکاران (۲۰۰۹) نیز از روش اکستروژن جهت درون‌پوشانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم استفاده کردند. نتایج حاکی از وجود اختلاف معنی داری بین زنده‌مانی باکتری-ها در دانک‌های پوشش‌دار و فاقد پوشش بود و ایجاد لایه اضافی از پروتئین آب پنیر به میزان زیادی زنده‌مانی باکتری‌ها در کپسول‌های آلژینات را بهبود بخشید [۲۲]. در میان نمونه-های دارای سیلیس، بیشترین تعداد باکتری‌های زنده درون کپسول‌های آلژینات با ۵ درصد سیلیس در روز بیست‌وهشتم با میانگین ٦/٨٥ سیکل لگاریتمی مشاهده شد. یعنی تعداد سلول های زنده با کمک این پوشش پس از گذشت بیست‌وهشت روز ۱/۲۵ سیکل لگاریتمی کاهش یافت که بهترین تیمار در میان کپسول‌های حاوی سیلیس بود درحالی‌که این کاهش برای غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ درصد، به‌ترتیب ۳/۵۳ و ٥/٢٤ سیکل لگاریتمی بود.

٤- نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق به نظر می‌رسد بتوان از سیلیس به همراه آلژینات برای درون‌پوشانی باکتری‌های پروبیوتیک بعنوان یک پوشش جدید استفاده کرد. البته همان-گونه که مشخص گردید پوشش آلژینات به دلیل این‌که منبع کربوهیدرات می‌باشد برای باکتری‌ها مفید بوده و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به خوبی از باکتری‌ها محافظت کرده است. از طرفی به دلیل منافذ موجود در آلژینات و تراوایی بیشتر نسبت به محیط پیرامون، باکتری‌ها توانستند از محلول مغذی اطراف خود استفاده کرده و زنده‌مانی خوبی را از خود نشان دهند. در غلظت ۵ درصد سیلیس همچنان زنده مانی باکتری همانند کپسول حاوی آلژینات تا روز چهاردهم حفظ گردید ولی با اضافه شدن غلظت سیلیس، به دلیل این که منافذ موجود در ساختار آلژینات کاملا پوشانیده می شود، باکتری نتوانست از مواد مغذی محلول استفاده نماید و با اتمام مواد مغذی، تعداد باکتری‌های زنده نیز با افزایش مدت زمان نگهداری کاهش یافت.

٥- منابع

[1] Cheow, W.S., Kiew, T.Y., & Hadinoto, K. (2014). Controlled release of *Lactobacil-lusrhamnosus* biofilm probiotics from alginate-locust bean gum microcapsules. Carbohydrate Polymers, 103, 587–595.

[2] Mortazavian, A.M., Azizi, A., Ehsani, M.R., Razavi, S.H., Mousavi, S.M., Sohrabvandi, S., & Reinheimer, J.A. (2008). Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. Milchwissenschaft, 63(4), 427–9.

[3] Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Dairy Journal, 13, 3–13.

[4] Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., Sada, A. & Orlando, P. (2009). Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated Lactobacillus acidophilus and survival under simulated gastrointestinal conditions. Journal of Functional Foods, 1(3), 319-323.

[5] Ribeiro, A.J., Silva, C., Ferreira, D. & Veiga, F. (2005). Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 25(1), 31-40.

[6] Tsen, J.H., Chen, H.H. & King, V.A.E. (2002). Survival of freeze-dried Lactobacillus acidophilus immobilized in kappa-carrageenan gel. The Journal of General and Applied Microbiology, 48(4), 237-241.

[7] Khosravi Zanjania, M.A., Ghiassi Tarzia, B., Sharifana A., & Mohammadi, N. (2014). Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastrointestinal condition.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-19]

Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 13(3), 843-852.

[8] Allan-Wojtas, P., Truelstrup Hansen, L. & Paulson, A.T. (2008). Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. LWT - Food Science and Technology, 41, 101-108.

[9] Mokarram, R.R., Mortazavi, S.A., Habibi Najafi, M.B., & Shahidi, F. (2009). The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. Food Research International, 42, 1040–1045.

[10] Sultana, K., Godward, G., Reynold, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. International Journal of Food Microbiology, 62, 47–55.

[11] Truelstup-Hansen, L., Allan-wojtas, P.M., Jin, Y.L., & Paulson, A.T. (2002). Survival of free and calcium–alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp*. in stimulated gastro-intestinal conditions. Food Microbiology, 19, 35–45.

[12] Kamaliana, N., Mirhosseinia, H., Mustafab, S., & AbdManap M. (2014). Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of *Bifidobacterium pseudocatenulatum G4* in simulated gastrointestinal fluid. Carbohydrate Polymers, 111, 700–706.

[13] Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G.S., & Anandharamakrishnan, C. (2012). Effect of whey protein-alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. Journal of Functional Foods, 4, 891–898.

[14] U.S. Food and Drug Administration. GRN No. 321: synthetic amorphous silica. LastUpdated: 30/11/2015. Last Accessed: 4/3/2016. URL:http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=321.

[15] Liu, J.N., Bu, W.B., & Shi, J.L. (2015). Silica coated up conversion nanoparticles: a versatile plat form for the development of efficient the ranostics. Accounts of Chemical Research, 48, 1797–805.

[16] Zhang, Y., Hsu, B.Y.W., Ren, C., Li X, & Wang, J. (2015). Silica-based nanocapsules: synthesis, structure control and biomedical applications. Chemical Society Reviews, 44, 315–35.

[17] Diaz, L.E., Alvarez, G., De simone, M.F. (2007). Immobilization of bacteria in silica matrices using citric acid in the sol-gel process. Applied Microbial Biotechnology, 73, 1059-1064.

[18] Coradin, T., Nassif, N., & Livage, J. (2003). Silica–alginate composites for microencapsulation. Applied Microbial Biotechnology, 61, 429–434.

[19] Hu, L., Sun, C., Song, A., Chang, D., Zheng, X., Gao, Y., Jiang, T., & Wang, S. (2015). Alginate encapsulated mesoporous silica nanospheres as a sustained drug delivery system for the poorly water-soluble drug indomethacin. Asian journal of pharmaceutical sciences, 9, 183-190.

[20] Mutlu, B.R., Hirschey, K., Wackett, L. P., & Aksan, A. (2015). Long-term preservation of silica gel-encapsulated bacterial biocatalysts by desiccation. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 74, 823–833.

[21] Fukushima, Y., Okamura, K., Imai, K.,&Motai, H., (1988). A new immobilization technique of whole cells and enzymes with colloidal silica and alginate. Biotechnology and Bioengineering, 32, 584-594.

[22] Gbassi, G.k., Randamme, T., Ennahar, s., & Marchioni, E. (2009). Microencapsulation of *lactobacillus plantarum spp* in an alginate matrix coated with whey proteins. International journal of food Microbiology, 129, 103-105.

[23] Sohail, A., Turner, M.S., Coombes, A., Bostrom, T., & Bhandari, B. (2011). Survivability probiotucs encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. International Journal of Food Microbiology, 145, 162-168.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-19]

[24] Xu, S.W., Jiang, Z.Y., Lu, Y., Wu, H., & Yuan, W.K. (2006). Preparation and catalytic properties of novel alginate−silica−dehydrogenase hybrid biocomposite beads. Industerial Engineering Chemistry Research, 45 (2), 511–517.

[25] Hyndman, C.L., Groboillot, A.F., & Poncelet, D. (1993). Microencapsulation of Lactococcus lactis within cross-linked gelatin membranes. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 56(3), 259–263.

[26] Klemmer, K.J., Korber, D.R., Low, N.H., & Nickerson, M.T. (2011). Pea protein-based capsules for probiotic and prebiotic delivery. International Journal of Food Science and Technology, 46, 2248–2256.

[27] Homayouni, A., Ehsani, M.R., Azizi, A., Yarmand, M.S., & Razavi, S.H. (2007). Effect of lecithin and calcium chloride solution on the microencapsulation process yield of calcium alginate beeds. Iranian Polymer Journal, 16, 597-606.

[28] Zachia ayub, M.A., Caren Coghetto, C., Brusch Brinques, G., Machado Siqueira, N., Pletsch, J., & Soares, R.M. (2016). Electrospraying microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* enhances cell viability under refrigeration storage and simulated gastric and intestinal fluids. Journal of Functional Food, 24, 316-326.

[29] Haffner, F.B., Girardona, M., Fontanay, S., Canilho, N., Duval, R.E., Mierzwa, M., Etienne, M., Diaba, R. & Pasc, A. (2016). Core-shell alginate@silica microparticles encapsulating probiotics. Journal of Materials Chemistry B, 4, 7929-7935.

[30] De Prisco, A., Maresca, D., Ongeng, D., Mauriello, G. (2015). Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. LWT-Food Science and Technology, 61, 452-462.

[31] Akin, M. B., Akin, M. S., & Kirmaci, Z. (2007). Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. Food Chemistry, 104(1), 93–99.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-19]

Evaluation of survival of encapsulated *Lactobacillus casei* with sodium alginate and silica

Ziaeian Yazdi Nezhad, F. [1], Najaf Najafi, M. [2*], Sarabi, M. [3]

1. M.Sc, Young Researchers and Elite Club, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
2. Associate Professor, Khorasan Razavi Agricultural and Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran.
3. Food Biotechnology Department, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran.

(Received: 2017/07/01 Accepted:2017/08/20)

Microencapsulation is one of the most effective methods for increasing the viability of probiotic bacteria. In this study, the use of alginate-silica coating for the purpose of encapsulation of *Lactobacillus casei* was evaluated. For this purpose, the encapsulation process was carried out with sodium alginate 1.5% and different levels of silica (5, 10 and 15% v / v) by extrusion method. The survival of free and encapsulated bacteria at 4°C for 28 days was investigated. Chemical reaction and linkage between alginate gel and silica were confirmed by FT-IR spectroscopy. With the addition of silica, the size of the capsules increased, but did not affect the encapsulation efficiency ($p<0.05$). The results showed that the number of free cells was reduced by 3.32 logarithmic cycles after the end of the storage period, while the decrease for the encapsulated bacteria was less significant. There was no significant difference between alginate and alginate samples with 5% silica in viability of 14 days. By increasing the concentration of silica, the number of live bacteria decreased during storage.

Key words: Probiotic, Encapsulation, Silica, Alginate, *Lactobacillus casei*.

* Corresponding Author E-Mail Address: mnajafi.mhd@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-19]