ارزیابی زنده‌مانی میکروکپسول‌های چند لایه سویه‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* درشرایط شبیه‌سازی شده معده و روده

افسانه چهره‌آرا ضیابری[۱]، فاطمه تابنده[۲]، **مریم اوتادی**[۱]*، افشار علی‌حسینی [۱]، علی پرتوی‌نیا [۳]

[۱] گروه مهندسی شیمی و پلیمر، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی،تهران، ایران

[۲] پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، تهران،

[۳] گروه پالایش زیستی، دانشکده مهندسی فناوری‌های نوین،دانشگاه شهید بهشتی،تهران،ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۹

چکیده

یکی از رویکردهای مهم در بحث کاربردهای غذایی و دارویی پروبیوتیک‌ها و اثربخشی آن‌ها در پیشگری و درمان بیماری‌ها، طراحی سیستم‌های کارآمد برای انتقال درون‌تنی هدفمند می‌باشد. در این پژوهش، سیستم جدیدی برای انتقال درون‌تنی هدفمند پروبیوتیک‌ها معرفی شده است. اهداف این پژوهش شامل: کارآمدی میکروژل‌های آنتی‌اسید پوشش داده شده، با فرمولاسیون پلی‌الکترولیت چند لایه آلژینات-کیتوزان با قابلیت‌زیستی باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده می‌باشد. دو سویه از باکتری‌های پروبیوتیک شامل *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به‌طور جداگانه در هیدروژل‌های آلژینات و کربنات‌کلسیم به‌عنوان یک عامل آنتی‌اسید (برای کنترل pH در شرایط اسیدی) ریزپوشانی شدند. سپس، توسط تکنیک خود مونتاژ لایه‌به‌لایه LbL، با دو لایه آلژینات-کیتوزان پوشش داده شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که دو عامل آنتی‌اسید و ریزپوشانی ۴ لایه آلژینات-کیتوزان در حضور آنزیم پپسین در pH =۱/۸ و آنزیم پانکراتین در pH=۶/۸، به‌طورقابل توجهی منجر به بهبود بقای باکتری‌های ریزپوشانی شده نسبت به باکتری‌های آزاد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، به ترتیب log(cfu/g) ۶ و log(cfu/g) ۲ می‌شوند.پس از عبور از سیستم شبیه‌سازی شده گوارشی، تعداد سلول‌های زنده باکتریایی در هر دو سویه پروبیوتیک، در حد قابل قبول ($۱۰^{۶}$cfu/ml) تعیین شد. به‌طورکلی، این نتایج نشان می‌دهد،که میکروژل‌های محافظ گوارشی پوشش داده شده با فرمولاسیون پلی‌الکترولیت چند لایه آلژینات –کیتوزان، می‌توانند در انتقال درون‌تنی کنترل‌شده پروبیوتیک‌ها به‌عنوان مکمل‌های غذایی به‌طور موفقیت‌آمیزی استفاده شوند.

واژگان کلیدی: آلژینات، پروبیوتیک، ریزپوشانی، میکروکپسول‌های چندلایه

*m_otadi@iauctb.ac.ir

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

مقدمه

بسیاری از مطالعات زیست‌شناسی و میکروبیولوژی بر اهمیت حیاتی حضور میکروبیوتای[1] نرمال برای حفظ سلامت تأکید می‌کنند(۱). نسبت مناسب بین فلور خوب یوبیوتیک[2] و بد آنتروپاتوژنیک[3] برای حفظ حالت بهزیستی ضروری است. هرگونه تغییر کمی و کیفی در این رابطه‌ی ظریف، منجر به رشد بیش از حد باکتری‌های آنتروپاتوژنیک می‌شود که به این حالت دیسبیوز[4] گفته می‌شود. دیسبیوز می‌تواند مجموعه‌ای از اثرات منفی را بر مخاط دستگاه گوارش آغاز کند. دیسبیوز در فعال نمودن پاسخ‌های التهابی نقش دارد. ظهور برخی از بیماری‌های پوستی، درماتیت[5] آلوپسی[6] و بیماری‌های عضلانی‌اسکلتی، آرتریت[7] بیماری‌های خودایمنی، بیماری تیروئید[8] پانکراتیت[9] و همچنین اختلالات خلقی، تحریک‌پذیری و افسردگی می‌تواند به‌طور غیر قابل باوری تظاهرات بالینی یک دیسبیوز پنهان روده‌ای باشند(۳و۲).

راهبردهای متعددی برای تغییر ترکیب و ساختار میکروبیوتای روده توسعه یافته‌اند. یکی از این رویکردها تجویز خوراکی پروبیوتیک‌ها،[10] سین‌بیوتیک‌ها[11] پست‌بیوتیک‌ها[12] می‌باشد(۴). اثرات مفید گونه‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[13] و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[14] بر سلامت انسان در آزمایش‌های بالینی بررسی شده است (۵). از آلژینات کلسیم به علت غیرسمی بودن، زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و هزینه پایین، به طور گسترده برای محصور کردن باکتری‌های پروبیوتیک استفاده شده است(۶). با این وجود، در برخی از مطالعات گزارش شده است که ریزپوشانی[15] باکتری‌ها در هیدروژل‌های آلژینات[16] از باکتری‌ها در شرایط دشوار گوارشی محافظت نمی‌کند. به‌طوریکه عوامل چیلاته‌کننده[17] مانند سیترات‌ها، فسفات‌ها، لاکتات‌ها (جاذب های یون کلسیم) و کاتیون‌های آنتی‌ژل مانند Na^{+}، Mg^{+2} ثبات مکانیکی ژل آلژینات را کاهش می‌دهند و در برخی از موارد می‌توانند سبب فروپاشی کامل ساختار ژله‌ای آلژینات شوند(۷). همچنین، در مطالعه دیگری گزارش شده است که هیدرولیز اسیدی آلژینات در محیط‌های اسیدی سبب خنثی شدن گروه هیدروکسیل و قطع پیوندهای عرضی بین هیدروکسیل آلژینات و کلسیم شده است. این امر به کاهش ثبات مکانیکی ژل آلژینات در محیط‌های اسیدی منجر می‌شود(۸). در سایر مطالعات به این نکته اشاره شده است که پوشش‌های پلیمری با افزایش پایداری مکانیکی و شیمیایی، منجر به بهبود عملکرد میکروژل‌های آلژینات می‌شوند(۹). بنابراین، بسیاری از منابع، پوشش‌دهی میکروبیدهای آلژینات را با یک پلیمر کاتیونی پیشنهاد داده‌اند(۶). در سایر پژوهش‌ها، تأثیر مواد پوششی بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک میکروانکپسوله شده با انواع مختلف مواد پوششی، مانند کیتوزان، سدیم آلژینات، پروتئین آب پنیر و پلی‌ال‌لیزین، مطالعه شد. نتایج این پژوهش‌ها نشان داد کیتوزان به دلیل توانایی مقاومت و محافظت از سلول‌های زنده پروبیوتیک در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده، بهترین بازدهی را نشان می‌دهد(۱۲-۱۰). علاوه برآن، مطالعات روی کیتوزان و مخاط نشان داده است تشکیل واکنش‌های هیدروژنی و واکنش‌های الکتروستاتیک بین بار مثبت آمین‌های کیتوزان با بار منفی گلیکوپروتئین‌های مخاط نقش مهمی در مخاط چسبی کیتوزان دارد،که سبب چسبیدن ریزدانک‌ها به سلول‌های اپیتلیال مخاط می‌شود(۱۴ و۱۳).در مطالعه دیگری گزارش شدکه

[1] microbiota
[2] Eubiotic
[3] Enteropathogenic
[4] Dysbiosis
[5] dermatitis
[6] alopecia
[7] musculoskeletal (arthritis)
[8] thyroiditis
[9] pancreatitis
[10] Probiotics
[11] Symbiotics
[12] Postbiotics
[13] *Lactobacillus Plantarum*
[14] *Lactobacillus Rhamnosus*
[15] Microencapsulation
[16] Alginate
[17] chelating agents

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

کیتوزان و آلژینات دارای دانسیته بار بالایی هستند و با افزایش زمان اقامت در روده قادر به رهایش هدفمند پروبیوتیک‌ها در روده هستند. بنابراین، شرایط مناسبی برای رسانش هدفمند پروبیوتیک‌ها به روده فراهم می‌کنند(۱۶ و۱۵). یکی از روش‌های پوشش‌دهی هیدروژل‌های کلسیم، روش لایه‌به‌لایه[1] (LbL)است. تکنیک ساده‌ی LbL، پژوهشگران را قادر می‌سازد بسیاری از سلول‌های زیستی را عامل‌دارکنند. توانایی طراحی پوسته با توجه به اندازه و نوع ترکیب به‌کار رفته در هر لایه، کنترل خواص کپسول‌ها مانند حساسیت به دما، pH، تراوایی و پایداری ساختاری را امکان‌پذیر کرده است. ترکیب به‌کار رفته در پوسته و ضخامت پوسته با توجه به شیمی سطح، نفوذپذیری انتخابی و انتشار، قابل طراحی است(۱۷). بر اساس پژوهش‌های بالینی، مقالات متعددی اثربخشی فرمولاسیون LbL را در زمینه کاربردهای درمانی گزارش می‌دهند(۲۵-۱۸). همچنین، از موارد دیگر پایداری ضعیف پروبیوتیک‌های محصور شده در هیدروژل‌های آلژینات در شرایط معده و روده، می‌توان به ورود یون‌های هیدروژن (H^+) به داخل شبکه هیدروژل و غیرفعال نمودن باکتری‌های کپسوله‌شده اشاره کرد.

برای افزایش پایداری پروبیوتیک‌ها در مسیر گوارشی، می‌توان از آنتی‌اسیدها استفاده کرد. آنتی‌اسیدهایی مانند $Mg(OH)_2$، یون‌های (OH^-) آزاد می‌کنند. بنابراین، میکروژل‌های آلژینات بارگذاری شده با یک عامل آنتی‌اسید $Mg(OH)_2$، می‌توانند یون‌های هیدروژن را هنگام ورود به میکروژل‌ها، خنثی کنند و محیط اسیدی را تحمل کنند(۲۶). از این‌رو، در این آزمایشات، برای افزایش قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط اسیدی معده و کنترل pH اسیدی معده، باکتری‌ها در هیدروژل‌های آنتی‌اسید (کربنات‌کلسیم) بارگزاری شدند. از $CaCO_3$ به‌عنوان یک عامل آنتی‌اسید در گرید غذایی و دارویی به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود و نسبت به $Mg(OH)_2$ در کنترل شرایط اسیدی معده عملکرد بهتری را نشان می‌دهد. بنابراین، در این پژوهش، ابتدا باکتری‌ها در هیدروژل‌های آنتی‌اسید بارگزاری شدند. برای ریزپوشانی هیدروژل‌های آنتی‌اسید از روش LbL رسوبی[2] استفاده شد. تکنیک LbL بر اساس جذب پی‌درپی ترکیبات با بار مخالف (پلی‌الکترولیت‌ها[3]، نانوذرات و پروتئین‌ها) متمرکز است. این روش بر اساس رسوب متوالی پلی‌کاتیون‌ها و پلی‌آنیون‌ها است،که از طریق برهمکنش‌های الکتروستاتیک به هم متصل شده‌اند. در این پژوهش تعداد لایه‌ها در فرمولاسیون سه لایه آلژینات-کیتوزان-آلژینات (ACA)، افزایش یافت و با هدف بررسی نقش کیتوزان در حفاظت ازباکتری‌ها در شرایط SGF و SIF، کیتوزان، در آخرین لایه قرار گرفت. سپس، هیدروژل‌های آنتی‌اسید، با استفاده از تکنیک LbL، طراحی شد. اولین لایه آلژینات یک پلیمر پلی‌آنیونی با گروه‌های کربوکسیل و دومین لایه، پلیمر پلی‌کاتیونی کیتوزان قرار داده شد. هدف از انجام این پژوهش ارزیابی دو عامل آنتی‌اسید(برای کنترل pH در شرایط اسیدی) و افزایش تعداد لایه‌ها در افزایش قابلیت زیستی و حفاظت از سلول در برابر شرایط سخت گوارشی است.

مواد و روش‌ها

مواد

سدیم‌آلژینات LB (با ویسکوزیته کم) از شرکت بیوشیمی Duchefa (Haarlem، هلند) تهیه شد.کیتوزان با وزن مولکولی پایین (448869 P سیگما آلدریچ)، نمک صفرا یا صفرای گاو (48305 P سیگماآلدریچ)، پپسین، (7000 P سیگماآلدریچ) و پانکراتین، (3292 P سیگما آلدریچ) نیز از سیگماآلدریچ کانادا خریداری شدند. گلوکزمنو هیدرات ($C_6H_{12}O_6.H_2O$) ، کلریدسدیم (NaCl)، کلسیم کلرید دی هیدرات (CaCl2.2H2O)،

[1] LbL (Layer by Layer)

[2] Layer by Layer deposition

[3] Polyelectrolytes

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

آگـــار، پتاســـیم دی هیدروژن‌فســـفات(KH2PO4)، تری‌سدیم‌ســـــــــیترات دی هیـــــــــــدروت (C6H8Na3O7.2H2O)، هیدروکسیدســـدیم (NaOH)، اسیدهیدروکلریک (HCl) نیز از شـرکت مـرک KGaA Darmstadt 64271 آلمـــان خریـــداری شـــد. دو گونـــه پروبیوتیـــک *لاکتوباسیلوس رامنوســوس* ATCC 7469 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 نیز تهیه شدند.

روش‌ها

تهیه استوک

در این پژوهش از سویه‌های *لاکتوباسلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به‌عنوان مدل پروبیوتیک استفاده شد. در ابتدا باکتری موردنظر در محیط کشت MRS Agar[1]،کشت ایزوله داده شد و در انکوباتور ثابت ۳۷°C به مدت ۴۸ h انکوبه شد. برای اطمینان از خلوص کشت‌ها،کلونی‌ها زیر میکروسکوپ مشاهده شدند. برای تهیه استوک، به کمک لوپ از تک‌کلونی در محیط broth، کشت مایع تهیه شد. این کشت به مدت ۱۶ h در دمای۳۷°C در انکوباتور ثابت قرار داده شد. سپس، با دور۴۰۰۰rpm و به مدت ۱۵ min سانتریفوژ شد و به نسبت یک به یک محیط کشت و گلیسرول ۲۰ ٪ به رسوب حاصله اضافه شد و استوک تهیه شده در فریزر در دمای ۸۰- °C نگهداری شد(۲۷ و۲۱).

تهیه سوسپانسیون باکتری

ابتدا ۴۰ml محیط‌کشت MRS broth در یک فالکون ۵۰ml ریخته شد. از استوک یک پیش‌کشت تهیه شد و در انکوباتور ثابت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. پس از ۸ h، OD به ۱ رسید. در این OD، ۵ ٪ از پیش‌کشت، داخل کشت اصلی تلقیح شد و در انکوباتور ثابت در دمای۳۷°C به مدت ۱۶ h انکوبه شد و فرایند ریزپوشانی در فاز سکون آغاز شد.

فرآیند میکروانکپسولاسیون ACAC

میکروانکپسولاسیون مطابق روش ایکبال[2] و همکاران(۲۰۱۸) انجام شد. سوسپانسیون باکتری بر طبق روش ذکر شده در بخش قبل تهیه شد و در دمای۴°C با دور ۴۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ min سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ، محلول رویی دور ریخته شد. رسوب باکتری با سرم فیزیولوژی ۰/۹ ٪ دو بار شست و شو داده شد. سپس، ۵ ml محلول آلژینات‌سدیم۱/۶ ٪ به رسوب باکتری اضافه شد. سپس، یک سرنگ استریل ۱۰ ml، با محلول، همگن شده سوسپانسیون باکتری و آلژینات‌سدیم پر شد و روی یک پمپ پیستونی با دبی ۲۹۵ mlit/hr و سرعت چرخش پیچ ۴۲/۵ rpm سوار شد. محلول همگن شده به‌صورت قطره‌های بسیارکوچک به ۱۰۰ ml محلول کلریدکلسیم (۰/۱M) که روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm در حال همزدن بود اکسترود[3] شد. پس از ۵ min میکروکپسول‌های سفت شده، شکل گرفت. سپس، جهت شستشوی ریزدانک‌ها ۰/۶۶ ٪ از محلول رویی دور ریخته شد و به همان اندازه محلول استریل آب نمک ۰/۹ ٪ اضافه شد. این عمل سه بار تکرار شد. سپس، ۱۵ ml محلول کیتوزان ۰/۴ ٪ استریل به میکروکپسول‌ها اضافه شد و به آرامی برای۳۰min روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm همزده شد. اولین لایه روی هسته آلژینات‌سدیم تشکیل شد. میکروکپسول‌ها با روش قبل شسته شدند و در مرحله بعد ۱۵ ml محلول آلژینات‌سدیم ۰/۱ ٪ به میکروکپسول‌ها اضافه شد و برای ۲۰ min دیگر محلول به آرامی همزده شد.پس از شستشوی میکروکپسول‌ها، در پایان یک محلول کیتوزان استریل ٪ ۰/۰۱ به میکروکپسول‌ها اضافه شد و محلول به آرامی برای ۳۰min دیگر همزده شد. میکروکپسول‌ها مجددا سه بارشسته شدند و کپسول نهاییACAC چهار لایه آلژینات-کیتوزان تشکیل شد(۲۷).

بررسی حل شدن ریزدانک‌ها در بـافر فسـفات و تری سدیم سیترات

[1] de Man, Rogosa and Sharpe medium (MRS)

[2] Iqbal

[3] extrude

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

ریزدانک‌ها مطابق روش ذکر شده در بخش قبل تهیه شدند. برای بررسی حل شدن ریزدانک‌های ۴ لایه ACAC، از دو محلول تری سدیم‌سیترات و محلول بافرفسفات استفاده شد. برای انجام آزمایش ریزدانک‌ها به ۴ قسمت با وزن g ۱ تقسیم شدند. سپس، g۱ یک گرم از ریزدانک‌ها به هر یک از فالکون‌های جداگانه استریل منتقل شد. به فالکون اول ml۱۰ محلول تری سدیم سیترات M ۰/۱ اضافه شد و به مدت min ۲۰ با دور rpm ۲۵۰ شیک شدند. فالکون دوم، به مدت min ۲۰ در ml ۱۰ محلول بافرفسفات با دور rpm ۲۵۰ شیک شد و فالکون سوم حاوی g ۱ از ریزدانک‌ها به مدت min ۱۰ در ml ۱۰ محلول تری‌سدیم‌سیترات و سپس min ۱۰ در ml ۱۰ بافرفسفات با دور rpm ۲۵۰ شیک شدند. آخرین فالکون به مدت min ۱۰ در ml ۱۰ بافرفسفات و سپس min ۱۰ در ml ۱۰ تری‌سدیم‌سیترات با دور rpm ۲۵۰ شیک شدند.

تهیه ریزدانک‌ها ۴ لایه ACAC به همراه آنتی‌اسید کربنات‌کلسیم

در ابتدا سوسپانسیون باکتری با روش ذکر شده در بالا تهیه شد. سپس فالکون حاوی سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ شد و رسوب باکتری با سرم فیزیولوژی ٪ ۰/۹ دو بار شست و شو داده شد. با استفاده از روش جی یو[1] و همکاران(۲۰۱۹) در ابتدا به رسوب باکتری، ml ۲ محلول کلسیم‌کربنات M ۰/۱ و ml ۳ محلول آلژینات ٪ ۳ اضافه شد. سپس، محلول همگن شده با استفاده از یک پمپ سرنگی به ml ۱۰۰ محلول کلسیم‌کلراید M۰/۱که با دور rpm ۲۰۰ درحال همزدن بود، اکسترود شد. پس از گذشت min ۱۵، ریزدانک‌ها به کمک صافی جدا شدند و در ml ۲۰ محلول کیتوزان ٪۰/۴ به مدت min ۳۰ غوطه‌ور شده و با دور rpm ۱۵۰ شیک شدند. بار دیگر ریزدانک‌ها به کمک صافی جدا شده و بعد از شست‌وشو به ml ۲۰ محلول آلژینات ٪۱منتقل شد. این ریزدانک‌ها به مدت min ۲۰ با دور rpm ۱۵۰ شیک شدند. ریزدانک‌ها به کمک صافی جدا شده و در آخرین مرحله، پس از شستشو ریزدانک‌ها در محلول کیتوزان ٪ ۰/۰۱ به مدت min ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شده و با دور rpm ۱۵۰ شیک شدند(۲۶).

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

در ابتدا ریزدانک‌ها ۴ لایه ACAC به همراه آنتی‌اسید با روش ذکر شده در بالا تهیه شدند. برای بررسی قابلیت زیستی باکتری‌های ریزپوشانی شده ACAC با استفاده از روش تومارو-داچنسو[2](۲۰۱۲)، ریزدانک‌ها به ۵ قسمت با وزن g ۱ تقسیم شدند. g ۱ از ریزدانک‌ها به هر یک از فالکون‌های جداگانه استریل منتقل شد. به فالکون اول ml ۱۰ تری‌سدیم‌سیترات اضافه شد. پس از حل شدن کامل ریزدانک‌ها و تهیه رقت، از روش cfu برای تعیین جمعیت اولیه باکتری‌ها استفاده شد. به فالکون‌های بعدی به میزان ml ۱۰ از محلول شبیه‌سازی معده (SGF) شامل: g/L ۲ سدیم کلراید، g/L ۳/۵ گلوکز، g/L ۳/۲ پپسین که pH آن توسط محلول HCl (۲M)، روی ۱/۸ تنظیم شده بود اضافه شد. این فالکون ها در انکوباتور شیکردار با دمای °C ۳۷ و با دور ۷۵rpm قرار داده شدند، پس از گذشت min۶۰، یکی از فالکون‌ها را خارج کرده و محلول رویی فالکون خالی شد و به آن ml۱۰ محلول تری‌سدیم‌سیترات اضافه شد و از روش cfu برای تعیین جمعیت باکتری‌ها استفاده شد. سپس، به ۳ فالکون باقی‌مانده که min ۶۰ در تماس با محلول شبیه‌سازی معده بودند، ml۱۰ محلول شبیه‌سازی روده (SIF) شامل: g/L ۶/۸ فسفات‌پتاسیم، g/L۱۰ پانکراتین، g/L ۳/۵ گلوکز که به کمک NaCl(۲M) که pHآن روی ۶/۸ تنظیم شده بود، اضافه شد و بار دیگر این فالکون ها در انکوباتور شیکردار قرار داده شدند و

[1] GU

[2] Tomaro-Duchesneau

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

پس از گذشت زمان‌های ۶۰min، ۹۰ و ۱۲۰ محلول رویی را خالی کرده و به آن ۱۰ ml تری‌سدیم‌سیترات اضافه شد و با تهیه رقت، cfu تعیین شد. تمامی محلول‌های مورد استفاده اتوکلاو شدند به جز محلول شبیه‌سازی معده و روده که فیلتر شدند(۲۱).

بررسی مورفولوژی میکروکپسول‌ها به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM

میکروکپسول‌ها ۴ لایه آلژینات-کیتوزان، ابتدا به روش خشک کردن تصعیدی خشک شدند. سپس، برای بررسی مورفولوژی میکروکپسول‌های ۴ لایه، از میکروسکوپ الکترونی روبشی و تکنیک SEM استفاده شد. مشاهده میکروکپسول‌ها به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی مدل (VEGA\\TESCAN-XMU) در مرکز پژوهش متالوژی رازی انجام شد.

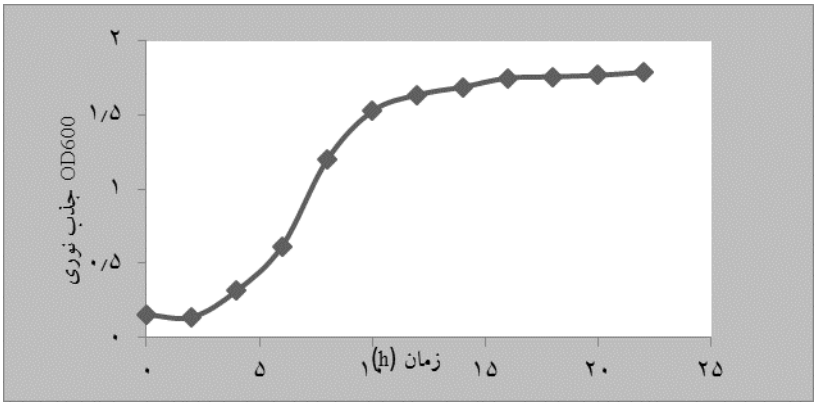
تحلیل آماری داده‌ها

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ با سطح معنی‌داری آزمون‌ها ($p\leq 0.05$) انجام شد و نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) ترسیم شده است.

نتایج

رسم منحنی رشد باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بر حسب زمان

منحنی رشد باکتری *لاکتوباسیلوس‌رامنوسوس* بر حسب زمان رسم شده و نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، باکتری در ۳ h اول در فاز تاخیری بوده و ساعت چهارم شروع به رشد نمایی کرده است و پس از گذشت ۱۶ h، باکتری *لاکتوباسیلوس‌رامنوسوس* وارد فاز ثابت می‌شود. در فاز ثابت، شرایط باکتری تثبیت شده و باکتری در هنگام ورود به فاز ثابت دارای بالاترین مقاومت در برابر تنش‌های محیطی است و مناسب‌ترین زمان برای جداسازی باکتری‌ها از محیط کشت است(۲۸). بنابراین، زمان ۱۶ h تا ۱۸، به‌عنوان زمان مناسب برای جدا کردن توده‌سلولی از محیط‌کشت و انجام فرآیند میکروانکپسولاسیون به‌دست آمد. بر اساس مطالعات قبلی، منحنی رشد لاکتوباسیلوس‌رامنوسوس در محیط کشت MRS در دمای گرم‌خانه‌گذاری ۳۷ °C تعیین شد. نتایج نشان داد باکتری *لاکتوباسیلوس‌رامنوسوس* بعد از ۵ h وارد فاز نمایی میانی و پس از ۱۱ h وارد فاز نمایی تاخیری شده و بعد از گذشت ۱۵/۵ h وارد فاز ثابت می‌شود(۲۹). در مطالعه دیگری منحنی رشد *لاکتوباسیلوس‌رامنوسوس* در محیط کشت MRS در دمای ۳۷ °C در فازهای مختلف رشد تعیین شد. دراین مطالعه باکتری پس از ۱۶ h وارد فاز ثابت رشد می‌شود(۳۰). نتایج این پژوهش با نتایج قبلی مطابقت دارد.

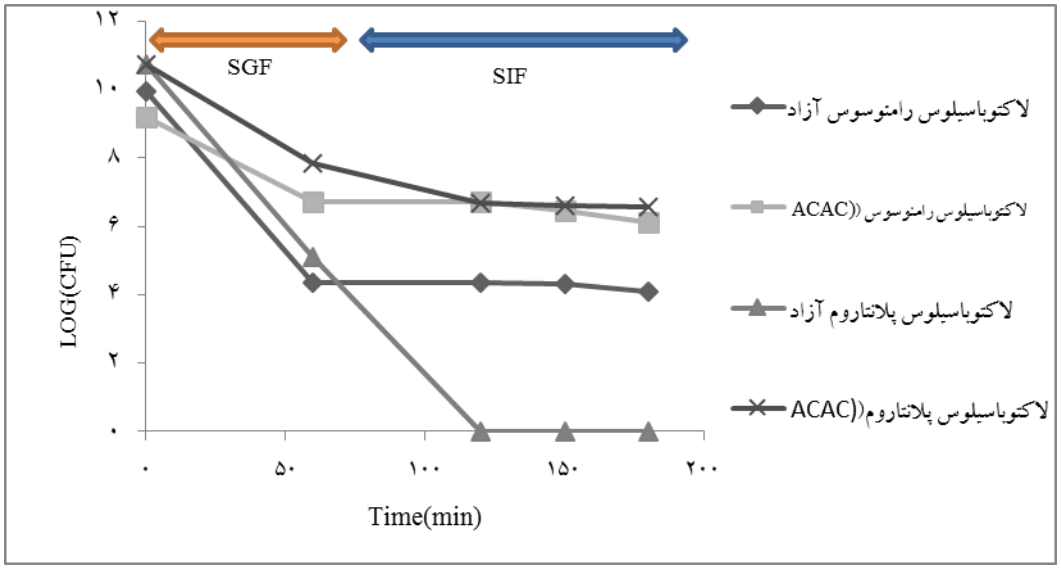


شکل ۱. منحنی رشد باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بر حسب زمان.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

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

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



شکل ۲. منحنی مقایسه زنده‌مانی *باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* آزاد بر حسب Log(cfu/ml) و ریزپوشانی شده چهار لایه (ACAC) برحسب Log(cfu/g) در زمان‌های مختلف شرایط شبیه‌سازی معده و روده

بررسی حل شدن ریزدانک‌ها در بافر فسفات و تری سدیم سیترات

در ابتدا برای رهایش باکتری‌ها از داخل ریزدانک‌ها، انحلال آن‌ها بررسی شد. ساخت ریزدانک‌های چند لایه همراه با آنتی‌اسید برای اولین بار، انجام شد بنابراین، برای تعیین نوع حلال مناسب و زمان لازم تا تخریب کامل ریزدانک‌ها، آزمایشی مطابق جدول زیر طراحی شد. بر اساس رفرنس‌های پیشین، از یکی از محلول‌های تری سدیم سیترات یا بافرفسفات برای انحلال ریزدانک ها استفاده می‌شود(۳۲ و۳۱، ۲۱) .

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

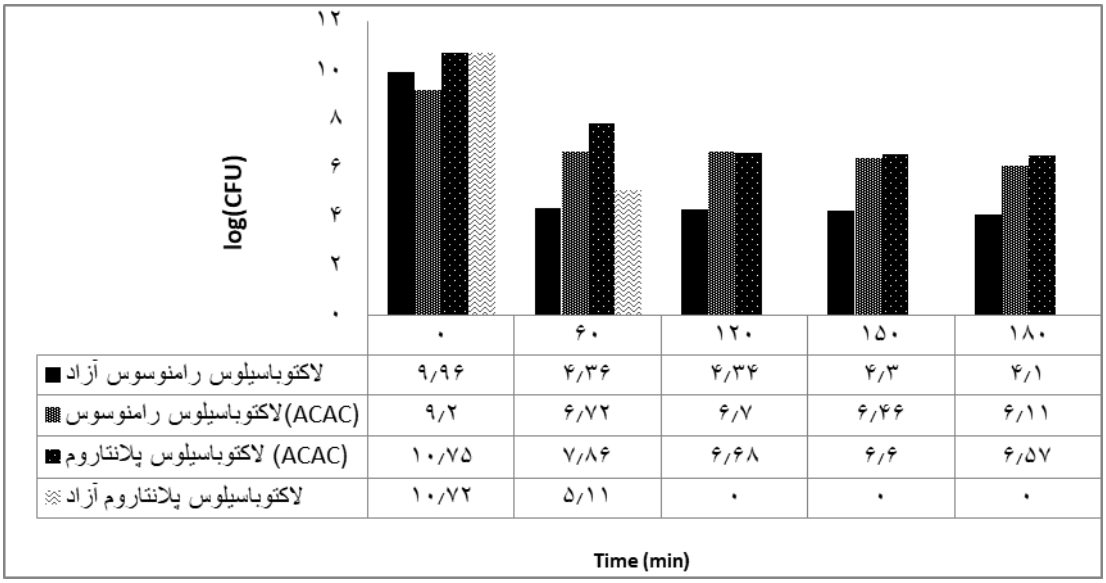
[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

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

هدف از انجام این بخش از آزمایشات بررسی اثر فرمولاسیون پلی‌الکترولیت چند لایه(ACAC) بر روی قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* محصور شده در هیدروژل‌های آنتی‌اسید در شرایط شبیه‌سازی معده (در حضور پپسین، pH=۱/۸) و شرایط شبیه‌سازی روده (در حضور پانکراتین، pH=۶/۸) می‌باشد.

در شکل ۲، زنده‌مانی باکتری‌های آزاد و باکتری‌های ریزپوشانی‌شده ۴ لایه ACAC *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به همراه کلسیم کربنات ۰/۱ M (به‌عنوان آنتی‌اسید) در محلول شبیه‌سازی معده و روده در بازه‌های زمانی تعیین‌شده، با هم مقایسه شده است. همان‌طورکه ملاحظه می‌شود، دو عامل ریزپوشانی چند لایه پلی‌الکترولیت و آنتی‌اسید، ۶ log(cfu/g) افزایش قابلیت زیستی را برای باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نسبت به باکتری‌های آزاد و ۲ log(cfu/g) برای باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* نسبت به باکتری‌های آزاد، در شرایط دشوار گوارشی به همراه دارد و افزایش بقای باکتری‌های کپسوله شده، نسبت به باکتری‌های آزاد به طور معنی داری مشاهده شد.

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



	۰	۶۰	۱۲۰	۱۵۰	۱۸۰
لاکتوباسیلوس رامنوسوس آزاد	۹/۹۶	۴/۳۶	۴/۳۴	۴/۳	۴/۱
لاکتوباسیلوس رامنوسوس (ACAC)	۹/۲	۶/۷۲	۶/۷	۶/۴۶	۶/۱۱
لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ACAC)	۱۰/۷۵	۷/۸۶	۶/۶۸	۶/۶	۶/۵۷
لاکتوباسیلوس پلانتاروم آزاد	۱۰/۷۲	۵/۱۱	۰	۰	۰

شکل ۳. نمودار ستونی مقایسه زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* آزاد برحسب log(cfu/ml) و ریزپوشانی شده چهار لایه (ACAC) برحسب Log(cfu/g)

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

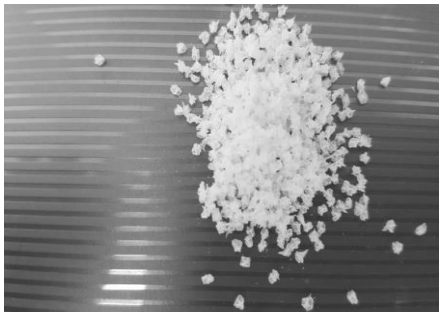
ریزپوشانی با فرمولاسیون ۴ لایه آلژینات-کیتوزان (ACAC) و عامل آنتی‌اسید توانسته است تأثیر چشمگیری بر قابلیت زیستی باکتری‌ها در شرایط شبیه‌سازی معده و روده داشته باشد و تعداد سلول‌های قابل دوام در شرایط GI در سطح درمانی تجویز شده است.

بررسی مورفولوژی میکروکپسول‌ها در حالت مرطوب و خشک کردن انجمادی

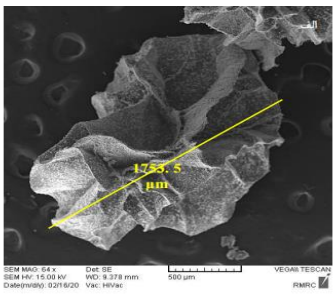
نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد، میکروژل‌های آلژینات‌کلسیم کروی شکل هستند (شکل ۴) و شکل آن‌ها با اضافه کردن کیتوزان تغییری نمی‌کند.

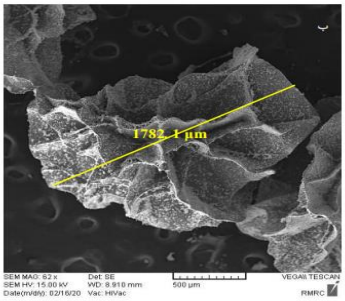


شکل ۴. میکروبیدهای آلژینات کلسیم



شکل۵- میکروکپسول های ۴ لایه آلژینات کیتوسان(ACAC) بعد از خشک کردن انجمادی





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

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

ریزپوشانی چندلایه آلژینات –کیتوزان تاثیری بر مورفولوژی ریزدانک‌های مرطوب ندارد، بنابراین، پیش از خشک کردن انجمادی، میکروکپسول‌های ۴ لایه کاملا یکنواخت و کروی شکل هستند، که با سایر مطالعات در این زمینه مطابقت دارد(۳۳). به علاوه، در پژوهش دیگری گزارش شد که پوشش‌دهی انواع مواد روی مورفولوژی ریزدانک‌ها تأثیری ندارد(۱۰).در این پژوهش مورفولوژی میکروکپسول‌های ۴ لایه آلژینات–کیتوزان (ACAC) پس از خشک کردن انجمادی با روشSEM تعیین شد. نتایج آزمون SEM نشان می‌دهد، میکروکپسول‌های ۴ لایه مورد بررسی دارای مورفولوژی گل شکل بوده و قطری حدود ۱/۸ mm دارند. شکل۶ (الف) با بزرگنمایی ۶۲ برابر و شکل ۶ (ب) با بزرگنمایی ۶۴ برابر نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود، خشک کردن انجمادی منجر به تغییرات قابل مشاهده در مورفولوژی میکروکپسول‌ها شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش بقای باکتری‌های کپسوله‌شده(ACAC) نسبت به باکتری‌های آزاد به این شکل قابل توضیح است که میکروژل‌های آلژینات بارگزاری شده با آنتی‌اسید (کربنات‌کلسیم) می‌توانند یون‌های هیدروژن را هنگام ورود به میکروژل‌ها، خنثی کنند. بنابراین، با حفظ pH خنثی داخلی، تحت شرایط اسیدی معده، زنده‌مانی این میکروژل‌های آنتی‌اسیدی، افزایش یافته است. علاوه برآن، ریزپوشانی چند لایه آلژینات –کیتوزان با افزایش مقاومت مکانیکی و شیمیایی، حفاظت بالاتر از سلول‌ها را فراهم می‌کند. ایجاد یک غشاء چند لایه متراکم به علت برهم‌کنش‌های یونی قوی بین آلژینات (گروه آنیونی) و کیتوزان (گروه کاتونی) در این شرایط حفاظت موثر و بهبود ثبات میکروکپسول‌ها را به خوبی توضیح می‌دهد. این غشاء متراکم مانع از ورود نمک‌های صفراوی به میکروکپسول‌ها شده و نقش بسیار مهمی در حفاظت از سلول‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی بازی می‌کند و شرایط دشوار گوارشی را برای باکتری‌های *لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم* قابل تحمل می‌کند. افزایش قابلیت زیستی باکتری‌های ریزپوشانی‌شده نسبت به باکتری‌های آزاد، نشان می‌دهد ریزپوشانی ۴ لایه روی انتقال مواد مغذی و دفع متابولیت‌ها[۱]وقفه ایجاد نکرده است و تعداد سلول‌های زنده و قابل دوام را برای هر دو سویه پروبیوتیک در شرایط GI[۲]در سطح درمانی تجویز شده، حفظ می‌کند. مورد دیگری که می‌توان به آن اشاره کرد این است که به‌نظر می‌رسد، تحمل غشاء چند لایه، در سویه‌های مختلف پروبیوتیک متفاوت است. نتایج آزمایشات نشان داد غشاء ۴ لایه (ACAC) از سوی باکتری *لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم* نسبت به باکتری *لاکتوباسیلوس‌رامنوسوس* بهتر تحمل شده است.

کامانی[۳] همکاران (۲۰۱۱) ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک با سه لایه آلژینات –کیتوزان –آلژینات (ACA) را سبب افزایش مقاومت مکانیکی ریزدانک‌ها در برابر شرایط دشوار GI و رسانش هدفمند سلول‌های زنده به روده دانست(۱۹). کوک و همکاران(۲۰۱۱) گزارش کردند که ریزپوشانی میکروژل‌های آلژینات با سه لایه (آلژینات –کیتوزان) ، قابلیت زیستی سلول‌ها را در شرایط گوارشی تا حداکثر ۰/۱۷ log(cfu)/ml + ۸/۸۴ در ماتریس‌های پوشش داده شده سه لایه (آلژینات–کیتوزان)، افزایش می‌دهد(۱۶). جیانگ[۴] و همکاران(۲۰۱۳) افزایش قابلیت زیستی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ریزپوشانی شده با فرمولاسیون آلژینات–کیتوزان –آلژینات (ACA)، را در شرایط SGF (pH =۲) و SIF (pH =۷/۲) گزارش می‌دهند، زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی شده ۳ لایه (ACA) بعد از min ۱۲۰ در محلولSGF و SIF به ترتیب بیش از ۶۵ ٪ و۷۵ ٪ به‌دست آمد(۳۴). در حالی‌که، پس از min ۶۰، هیچ یک از باکتری‌های آزاد در محلول شبیه‌سازی معده (SGF) در

[۱] Metabolites
[۲] Gastrointestinal
[۳] Kanmani
[۴] Jiang

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

حضور پپسین زنده نماندند. در پژوهشی که راموس[1] و همکاران (۲۰۱۶) انجام دادند، سیستم جدیدی را برای انتقال درون‌تنی باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* (تولیدکننده فولیک اسید) طراحی کردند و باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* را با پوشش‌های چند لایه، آلژینات-پلی‌ال‌لایزین-آلژینات-کیتوزان ریزپوشانی نمودند و اثر مثبت این فرمولاسیون را در حفاظت از باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* در برابر شرایط سخت گوارشی نشان دادند. در این پژوهش، تعداد سلول‌های زنده‌ی *لاکتوکوکوس لاکتیس* بعد از عبور از شرایط دشوار گوارشی در حد قابل قبول (۱۰۶ cfu/ml) بود، درحالی‌که، هیچ یک از باکتری‌های بدون پوشش *لاکتوکوکوس لاکتیس* پس از ۹۰ min قرار گرفتن در شرایط شبیه‌سازی معده، زنده نماندند. مطالعات متعدد نشان داده است که پوشش‌های کیتوزان بازده بالایی در حفاظت از سویه‌های مختلف پروبیوتیک در برابر شرایط دشوار گوارشی دارند و زنده مانی غلظت مناسبی از سلول‌های پروبیوتیک را تا رسیدن به روده حفظ می‌کنند (۳۵ و۲۵، ۲۲، ۱۵، ۱۲). نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های حاصل از این مطالعات مطابقت دارد. همچنین، می‌توان از فناوری‌های مختلف و مواد هسته‌ای متفاوت، برای توسعه ریزپوشانی کردن پروبیوتیک‌ها با پوشش‌های کیتوزان و در نتیجه میکروکپسول‌هایی با ویژگی‌های مختلف در اندازه ذرات، انواع کپسول و بازده حفاظتی استفاده کرد. مطالعات در این زمینه نشان می‌دهد، پایداری مکانیکی کپسول‌های پوشش داده شد با کیتوزان، به ضخامت لایه خارجی کیتوزان و به مقدار کیتوزان اتصال یافته به هیدروژل‌های آلژینات بستگی دارد. بنابراین، فاکتورهایی که اتصال بین دو پلیمر آلژینات و کیتوزان را افزایش می‌دهند نیز می‌توانند پایداری کپسول‌ها را افزایش دهند. همچنین، افزایش مقاومت مکانیکی بالاتری در کپسول‌های ساخته شده از کیتوزان با غلظت بیشتر و وزن مولکولی پایین‌تر مشاهده شده است. هنگامی‌که بیشتر کربوکسیل های دارای بار منفی روی سطح هیدروژل‌های آلژینات با بار مثبت گروه‌های آمینی موجود در ساختار کیتوسان محدود می‌شوند، ضخامت غشاء، حتی با افزایش غلظت کیتوسان افزایش پیدا نمی‌کند. همچنین، کیتوسان به‌عنوان یک ماده پوششی، پایداری کپسول‌های حاوی پروبیوتیک را در طول ذخیره سازی به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد(۱۵). همانطور که در شکل ۵ ملاحظه می‌شود، خشک کردن انجمادی منجر به تغییرات قابل مشاهده در مورفولوژی میکروکپسول‌ها شده است. در شکل ۶ پس از خشک کردن انجمادی، ریزدانک‌ها چروکیده شده‌اند که با از دست دادن رطوبت ریزدانک‌ها، قابل توضیح است. همچنین، این ناهمواری سطحی می‌تواند به دلیل وجود سلول‌های باکتریایی در سطوح ریزدانک‌های کم آب شده باشدکه با یافته‌های یااو[3] و همکاران (۲۰۱۶) به خوبی تطابق دارد(۳۶). در این آزمایش از تکنیک اکستروژن، به‌عنوان متداول‌ترین تکنیک برای میکروانکپسولاسیون پروبیوتیک‌ها استفاده شد. پارامترهای متعددی مانند قطر نازل، غلظت پلیمر می‌توانند بر اندازه و عملکرد کپسوله‌سازی ریزدانک‌های تولید شده توسط روش اکستروژن تأثیر بگذارند، همان‌طور که در مطالعات قبلی گزارش شده است اندازه ریزدانک‌ها عاملی بسیار مهم در پایداری و کارایی کپسوله‌سازی است. ریزدانک‌ها با اندازه بزرگ‌تر، حفاظت بیشتری نسبت به ریزدانک‌ها با اندازه کوچک‌تر فراهم می‌کنند. با این‌حال، برخی از نشریات اعلام کرده‌اند که ریزدانک‌ها با اندازه‌های کوچک‌تر برای جلوگیری از تاثیر حسی ناخوشایند در محصولات غذایی ترجیح داده می‌شوند (۳۷). نتایج این پژوهش نشان داد که در صورت استفاده از اکسترودر با قطر نازل کوچک‌تر (تجهیزات پیشرفته‌تر)، ریزدانک‌هایی با اندازه بسیار کوچک‌تر به‌دست خواهد آمد. مطالعات نشان

[1] Ramos
[2] *Lactococcus Lactis*
[3] Yao

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

می‌دهد استفاده از آلژینات با گلورونیک پایین، منجر به تشکیل دانه‌هایی با قطر کمتر می‌شود. برای دستیابی به میکروکپسول‌هایی با سایز کوچک‌تر می‌توان از تکنیک امولوسیون استفاده کرد. سایز میکروکپسول‌ها، در تکنیک امولوسیون در مقایسه با تکنیک اکستروژن به شدت کاهش می‌یابد. سایز میکروبیدها در روش امولوسیون با طراحی راکتور، میکسر و سرعت همزن کنترل می‌شود. البته این تکنیک در مقایسه با روش اکستروژن گران قیمت‌تر می‌باشد زیرا در این روش، برای تهیه امولوسیون ،مقدار زیادی روغن گیاهی مورد نیاز است. میکروکپسول‌های چند لایه آلژینات- کیتوزان، قابلیت زیستی غلظت مناسبی از باکتری‌های پروبیوتیک را تا رسیدن به روده را حفظ می‌کنند. امید است تحقیقات بیشتر در زمینه فناوری LbL و طراحی میکروکپسول‌ها با انواع ترکیبات پلیمری و ضخامت‌های متفاوت، چشم‌انداز جدیدی در زمینه انتقال درون‌تنی موفق مکمل‌های غذایی پروبیوتیک فراهم کند.

تقدیر و تشکر

با تشکر از جناب آقای دکتر علی اکبری و خانم مهندس رحیمی کارشناسان محترم آزمایشگاه صنعت، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، به دلیل همکاری شایسته‌ای که داشته‌اند. همچنین، از همکاری صمیمانه خانم مهندس پریسا خدادادی با مجری پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

1. Anselmo AC, McHugh KJ, Webster J, Langer R, Jaklenec A. Layer-by-Layer Encapsulation of Probiotics for Delivery to the Microbiome. Adv Mater. 2016; 28(43): 9486–90.

2. Dinan TG, Cryan JF. Brain-Gut-Microbiota Axis and Mental Health. Psychosom Med.2017;79(8):920–6.

3. Tomasello G, Sorce A, Damiani P, Sinagra E, Carini F. The importance of intestinal microbial flora (microbiota) and role of diet. Prog Nutr. 2017; 19(3):342–4.

4. Yao M, Xie J, Du H, McClements DJ, Xiao H, Li L. Progress in microencapsulation of probiotics:A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2020.p:857-874

5. Larypoor M, Shams K, Hatami F. Evaluation of the effect of Lactobacillus Plantarum as a probiotic supplement on colorectal cancer affected by fatty foods. Applied Microbiology in Food Industry. 2022; 7(3): 64-75

6.Amin T, Thakur M, Jain S. Microencapsulation-the Future of Probiotic Cultures. J Microbiol Biotechnol & Food Sciences. 2020; 10: 35–43.

7. Simó G, Fernández-Fernández E, Vila-Crespo J, Ruipérez V, Rodríguez-Nogales JM. Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation. Vol. 170, Carbohydrate Polymers. 2017. p. 1–14.

8. Kamalian N, Mirhosseini H, Mustafa S, Manap MYA. Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of Bifidobacterium pseudocatenulatum G4 in simulated gastrointestinal fluid. Carbohydr Polym [Internet]. 2014;111:700–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.014

9. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth HC. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. LWT - Food Sci Technol. 2006; 39(2): 177–83.

10. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. Int Dairy J. 2004;14(8):737–43.

11. Ramos, P. E., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2018). Physiological protection of probiotic microcapsules by coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *58:* (11) 1864–1877

12. Zou Q, Zhao J, Liu X, Tian F, Zhang H ping, Zhang H, et al. Microencapsulation of Bifidobacterium bifidum F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. Int J Food Sci Technol. 2011;46(8):1672–8.

13. Ramos PE, Abrunhosa L, Pinheiro A, Cerqueira MA, Motta C, Castanheira I, et al. Probiotic-loaded microcapsule system for human in situ folate production: Encapsulation and system validation. Food Res Int. 2016; 90:25-32

14. Ramos, P. E., Cerqueira, M. A., Cook, M. T., Bourbon, A. I., Khutoryanskiy, V. V., Charalampoulos, D., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2016). Development of an immobilization system for in situ micronutrients release. *Food Research International*. *90*: 121–132

15. Calinoiu LF, Ștefanescu BE, Pop ID, Muntean L, Vodnar DC. Chitosan coating applications in probiotic microencapsulation. Coatings. 2019;9(3): 1–2

16. Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy V V. Production and evaluation

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

gastroprotective microgels: Improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions. Food Hydrocoll. 2019;91:283–9.
27. Iqbal UH, Westfall S, Prakash S. Novel microencapsulated probiotic blend for use in metabolic syndrome: design and in-vivo analysis. Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol. 2018; https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1489270
28. Zaghari L, Bassiri AR, Rahimi S, Zonusi A. Developing probiotic bread using Lactobacillus reuteri part 1: Evaluation of fluidized bed microencapsulation on viability of Lactobacillus reuteri in simulated gastrointestinal conditions. Iranian Food Science and Technology.2018; 13(5), 844–857. doi: 10.22067/ifstrj.v1395i0.56856.
29. Cicenia A, Santangelo F, Gambardella L, Pallotta L, Iebba V, Scirocco A, Marignani M, Tellan G, Carabotti M, Corazziari ES, Schippa S & Severi C. Protective Role of Postbiotic Mediators Secreted by Lactobacillus rhamnosus GG Versus Lipopolysaccharide-induced Damage in Human Colonic Smooth Muscle Cells. Journal of Clinical Gastroenterology, 50(December 2016), S140–S144.
30. Broeckx G, Kiekens S, Jokicevic K, Byl E, Henkens T, Vandenheuvel D, Lebeer S &, Kiekens F. Effects of initial cell concentration, growth phase, and process parameters on the viability of Lactobacillus rhamnosus GG after spray drying. Drying Technology. 2020; 38(11), 1474–1492.
31. Mohammadi j, et al. Effect of Microencapsulation on survival of *Lactobacillus casei* in simulated gastrointestinal conditions and thermal treatment. Innovative Food Technologies. 2016; 4(13):31-43.DOI:
32. Yousefi H, Soleimanian-Zad S, Shahedi Bagh Khandan M. Microencapsulation of Probiotics by
Emulsion Method for Production of Probiotic Bread. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2017; 11(4):99-106
33. Koo SM, et al. Improvement of the Stability of Lactobacillus Casei YIT 9018 by Microencapsulation Using Alginate and Chitosan. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2001; 11(3):376–83.
34. Jiang T, Kim YK, Singh B, Kang SK, Choi YJ, Cho CS. Effect of microencapsulation of lactobacillus plantarum 25 into alginate/chitosan/alginate microcapsules on viability and cytokine induction. J Nanosci Nanotechnol. 2013;13(8):5291–5.
35. Singh P, Medronho B, Alves L, da Silva GJ, Miguel MG, Lindman B. Development of carboxymethyl cellulose-chitosan hybrid micro- and macroparticles for encapsulation of probiotic bacteria. Carbohydr Polym. 2017;175:87–95.

of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. Biomacromolecules. 2011;12(7):2834–40.
17. Fakhrullin RF, Lvov YM. “face-lifting” and “make-up” for microorganisms: Layer-by-layer polyelectrolyte nanocoating. ACS Nano. 2012. https://doi.org/10.1021/nn301776y
18. Chow KM, Liu ZC, Prakash S, Chang TMS. Free and Microencapsulated Lactobacillus and Effects of Metabolic Induction on Urea Removal. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 2003;31(4):425–34.
19. Kamalian N, Mirhosseini H, Mustafa S, Manap MYA. Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of Bifidobacterium pseudocatenulatum G4 in simulated gastrointestinal fluid. Carbohydr Polym. 2014;
20. Kumar M, Nagpal R, Kumar R, Hemalatha R, Verma V, Kumar A, et al. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. Vol. 2012, Experimental Diabetes Research. 2012.
21. Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Malhotra M, Coussa-Charley M, Kahouli I, Jones ML, et al. Probiotic ferulic acid esterase active Lactobacillus fermentum NCIMB 5221 APA microcapsules for oral delivery: Preparation and in vitro characterization. Pharmaceuticals. 2012;5(2):236–48.
22. Trabelsi I, Bejar W, Ayadi D, Chouayekh H, Kammoun R, Bejar S, et al. Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. International Journal of Biological Macromolecules. 2013;61:36–42.
23. Urbanska AM, Paul A, Bhahena J, Prakash S. Suppression of Tumorigenesis: Modulation of Inflammatory Cytokines by Oral Administration of Microencapsulated Probiotic Yogurt Formulation. Int J Inflam. 2010;2010:1–10.
24. Yucel Falco C, Sotres J, Rascón A, Risbo J, Cárdenas M. Design of a potentially prebiotic and responsive encapsulation material for probiotic bacteria based on chitosan and sulfated β-glucan. J Colloid Interface Science. 2017;487:97–106.
25. Zaeim D, Sarabi-Jamab M, Ghorani B, Kadkhodaee R, Tromp RH. Electrospray assisted fabrication of hydrogel microcapsules by single- and double-stage procedures for encapsulation of probiotics. Food Bioprod Process. 2017;102:250–9.
26. Gu M, Zhang Z, Pan C, Goulette TR, Zhang R, Hendricks G, et al. Encapsulation of Bifidobacterium pseudocatenulatum G7 in

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

36. M. Yao, J. Wu, B. Li, H. Xiao, D. J. McClements, and L. Li, “Microencapsulation of Lactobacillus salivarious Li01 for enhanced storage viability and targeted delivery to gut microbiota,” *Food Hydrocoll.*, vol. 72, pp. 228–236, 2017, doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.05.033.

37. Shi LE, Li ZH, Li DT, Xu M, Chen HY, Zhang ZL, et al. Encapsulation of probiotic lactobacillus bulgaricus in alginate’milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. J Food Eng [Internet]. 2013;117(1):99–104.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

Evaluation of viability of multilayer microcapsules of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus Plantarum* under gastric and intestinal simulation conditions

Afsaneh Chehreara[1], Fatemeh Tabandeh[2], **Maryam Otadi**[*1], Afshar Alihosseini[1], Ali Partovinia[3]

[1]Department of Chemical Engineering and Polymer, Tehran Central Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Departments of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), 1497716316, Tehran, Iran
[3]Faculties of New Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Abstract

In order to targeted delivery of probiotics for food and drug applications and their effectiveness in preventing and treating various diseases, designing effective systems in this field can be helpful. In this paper, a new system for targeted delivery of probiotics has been introduced. The objectives of this study included: the efficiency of anti-acid microgels coated by multilayer polyelectrolyte formulation of alginate-chitosan for survivability of probiotic bacteria in gastric and intestinal simulation conditions. Tow Strains of probiotic bacteria including *Lactobacillus Rhamnosus* and *Lactobacillus Plantarum* were encapsulated separately in alginate hydrogels and calcium carbonate as an antacid agent (to control pH under acidic conditions) and coated with double bilayer alginate-chitosan by LbL self-assembly technique. The results showed that (in the presence of pepsin enzyme and at pH=1.8 and in the presence of pancreatin enzyme and at pH=6.8), the survivability of these bacteria increased significantly compared to *lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* 6 log(cfu/g) and 2.5 log(cfu/g) respectively. The number of viable cells in both probiotic strains was higher than the acceptable therapeutic level. In general, these results showed that these microcapsules can be used in controlled delivery of probiotics as food supplements successfully.

Keywords: Alginate, Probiotics, Microencapsulation, Multilayer Microencapsulation

*m_otadi@iauctb.ac.ir

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]