



**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE ZOOTEHNIE ȘI BIOTEHNOLOGII
ȘCOALA DOCTORALĂ: RESURSE VEGETALE ȘI ANIMALE
DOMENIU: BIOTEHNOLOGII**

POP OANA LELIA (MUREȘAN)

**DEZVOLTAREA UNOR SISTEME INOVATIVE DE ÎNCAPSULARE A
PROBIOTICELOR, CU APLICAȚII ÎN BIOMEDICINĂ**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
Prof. Dr. Carmen Socaciu**

CLUJ-NAPOCA

2014

CUPRINS

INTRODUCERE. SCOP ȘI OBIECTIVE.....	VI
REZULTATE EXPERIMENTALE	VIII
CAPITOLUL 1	IX
MICROÎNCAPSULAREA <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> CU SUC VERDE DE LUCERNĂ, CA PREBIOTIC, ÎN MICROSFERE DE ALGINAT-CHITOSAN ȘI STUDIAREA COMPORTAMENTULUI ACESTORA ÎN CONDIȚII GASTROINTESTINALE SIMULATE.....	IX
INTRODUCERE.....	IX
1.1. MATERIALE ȘI METODE.....	X
1.1.1. Materiale.....	X
1.1.2. Sucul verde de lucernă - procedeu de obținere și caracterizare	X
1.1.3. Tulpină probiotică: <i>Lactobacillus plantarum</i>	X
1.1.4. Obținerea microsferelor de alginat	XI
1.1.5. Caracterizarea morfologică a microsferelor	XI
1.1.6. Rezistența în mediu gastrointestinal. Prepararea sucului gastric și intestinal	XI
1.1.7. Viabilitatea celulară.....	XII
1.1.8. Analiza statistică.....	XII
1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII	XII
1.2.1. Procedeu de obținere a sucului verde de lucernă	XII
1.2.2. Structura microsferelor cu <i>L. plantatum</i>	XII
1.2.3. Supraviețuirea celulelor probiotice libere și încapsulate, în suc gastric ..	XIII
1.2.4. Supraviețuirea celulelor probiotice libere și încapsulate, în suc intestinal	XIV
1.3. CONCLUZII.....	XV

CAPITOLUL 2	XVI
INFLUENȚA MATRICILOR FOLOSITE PENTRU ÎNCAPSULAREA PROBIOTICELOR ASUPRA PROPRIETĂȚILOR MICROSFERELOR ȘI A VIABILITĂȚII CELULELOR PROBIOTICE	XVI
INTRODUCERE	XVI
2.1. MATERIALE ȘI METODE	XVI
2.1.1. Polimeri utilizați ca și material de umplere	XVI
2.1.2. Pregătirea microorganismelor, mediul și condițiile de creștere	XVII
2.1.3. Încapsularea <i>B. lactis 300B</i> în microsferă de alginat	XVII
2.1.4. Proprietățile mixului de alginat – material de umplere	XVII
2.1.5. Eficiența încapsulării probioticului <i>B. lactis 300B</i>	XVIII
2.1.6. Determinarea dimensiunii și formei microsferelor	XVIII
2.1.7. Determinarea formei microsferelor	XVIII
2.1.8. Liofilizarea microsferelor	XIX
2.1.9. Determinarea densității în vrac, tasată și capacitatea de curgere	XIX
2.1.10. Viabilitatea <i>B. lactis 300B</i> înainte și după încapsulare și liofilizare	XIX
2.1.11. Testul stabilității microsferelor liofilizate	XX
2.1.12. Analiza statistică	XX
2.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII	XX
2.2.1. Randamentul de încapsulare și eficiența încapsulării	XX
2.2.2. Proprietățile mixului alginat-material de umplere. Dimensiunea și forma microsferelor	XXI
2.2.3. Densitatea în vrac, tasată și capacitatea de curgere a microsferelor liofilizate	XXIV
2.2.4. Supraviețuirea <i>B. lactis 300B</i> în microsferele obținute	XXV
2.2.5. Viabilitatea după liofilizare	XXVII
2.2.6. Supraviețuirea celulelor probiotice în microsferele liofilizate	XXVIII
2.3. CONCLUZII	XXIX

CAPITOLUL 3	XXX
ÎNCAPSULAREA PROBIOTICULUI <i>BIFIDOBACTERIUM LACTIS 300B</i> ȘI TESTAREA VIABILITĂȚII ACESTUIA ÎNAINTE ȘI DUPĂ ÎNCAPSULARE, COATING ȘI LIOFILIZARE	XXX
3.1. MATERIALE ȘI METODE.....	XXXI
3.1.1. Materiale.....	XXXI
3.1.2. Tulpina probiotică	XXXI
3.1.3. Pregătirea microsferelor de alginat-pululan	XXXI
3.1.4. Dimensiunea microsferelor	XXXI
3.1.5. Aplicarea coating-ului pe microsferele de alginat-pululan	XXXII
3.1.6. Procesul de liofilizare	XXXII
3.1.7. Viabilitatea celulară.....	XXXII
3.1.8. Evaluarea eliberării celulelor probiotice <i>B. lactis 300B</i> în mediu intestinal simulat.....	XXXIII
3.1.9. Analiza statistică.....	XXXIII
3.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII	XXXIII
3.2.1. Caracterizarea procesului de încapsulare	XXXIII
3.2.2. Caracterizarea microsferelor. Eficiența încapsulării	XXXIII
3.2.3. Viabilitatea celulelor probiotice <i>B. lactis 300B</i>	XXXIV
3.2.4. Efectul liofilizării pe timp îndelungat asupra viabilității celulelor probiotice	XXXV
3.2.5. Eliberarea celulelor probiotice <i>B. lactis 300B</i> în mediul intestinal simulat	XXXVI
3.3 CONCLUZII.....	XXXVI
CAPITOLUL 4	XXXVIII
COMPARAREA STABILITĂȚII PROBIOTICULUI <i>LACTOBACILUS CASEI</i> LIBER ȘI ÎNCAPSULAT DEPOZITAT ÎN IAURT	XXXVIII
INTRODUCERE.....	XXXVIII

4.1.1. Pregătirea microorganismelor, mediul și condițiile de creștere	XXXIX
4.1.2. Microîncapsularea probioticului <i>L. casei</i>	XXXIX
4.1.3. Examinarea microsferelor din alginat și a celor din alginat-pectină ..	XXXIX
4.1.4. Liofilizarea microsferelor ce conțin <i>L. casei</i>	XXXIX
4.1.5. Obținerea iaurtului cu microsferă ce conțin <i>L. casei</i>	XXXIX
4.1.6. Dinamica acidifierii iaurtului ce conține <i>L. casei</i> , încapsulat și neîncapsulat	XL
4.1.7. Determinarea numărului de celule viabile.....	XL
4.1.8. Analiza statistică.....	XLI
4.2. RESULTATE ȘI DISCUȚII.....	XLI
4.2.1. Caracterizarea microsferelor obținute	XLI
4.2.2. Iaurt cu conținut de probiotice încapsulate.....	XLI
4.2.3. Dinamica acidifierii iaurtului	XLI
4.2.4. Viabilitatea probioticului <i>L. casei</i> încapsulat, introdus în iaurt pe o perioadă de 35 zile	XLII
4.3. CONCLUZII.....	XLIII
CONCLUZII GENERALE	XLIV
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE.....	XLVI

INTRODUCERE. SCOP ȘI OBIECTIVE

Încapsularea este o tehnologie în curs de dezvoltare aplicată pentru protecția și eliberarea controlată a celulelor probiotice și nu numai.

Munca de pionierat în domeniul microîncapsulării a fost efectuată cu mult timp în urmă de Chang (Chang, 1971) care a folosit încapsularea, în scopul de a stabiliza enzime. De atunci, încapsularea celulelor a câștigat un interes semnificativ într-o gamă largă de aplicații, precum farmacie, medicină, producția alimentelor, agricultură și protecția mediului. Utilizarea celulelor probiotice încapsulate în diverse procese biotehnologice s-a dovedit a fi avantajoasă spre deosebire de utilizarea celulelor libere, neîncapsulate.

Scopul prezentei lucrări a fost dezvoltarea de noi rețete și tehnici de încapsulare adaptate la microorganisme probiotice și investigarea comportamentului probioticelor înainte, în timpul și după încapsulare. Diferite tipuri de matrici de încapsulare au fost folosite cu scopul de a dezvolta o formulă optimă pentru o eficiență ridicată de imobilizare și viabilitate celulară mare. Comportamentul celulelor probiotice încapsulate a fost studiat în condiții gastrointestinale simulate. Testarea viabilității și supraviețuirii celulelor probiotice în iaurt pe întreaga perioadă de depozitare au fost de asemenea testate.

Obiectivele principale ale studiilor experimentale au fost:

- Microîncapsularea *Lactobacillus plantarum* cu suc verde de lucernă, ca prebiotic, în microsferă de alginat-chitosan și studierea comportamentului acestora în condiții gastrointestinale simulate.
- Determinarea influenței matricii de încapsulare și a parametrilor tehnici asupra proprietăților fizice ale microsferelor și corelația acestora cu capacitatea de supraviețuire a celulelor probiotice.
- Examinarea comportamentului probioticului *Bifidobacterium lactis 300B* după încapsularea în diferite tipuri de microsferă.
- Comparare între stabilitatea probioticului *Lactobacillus casei* liber și încapsulat, introdus în iaurt pe o perioadă lungă de depozitare.

Structura tezei. Lucrarea de față este structurată în două părți, prima reprezentată de studiul literaturii de specialitate și a doua, axată pe contribuții originale.

Prima parte cuprinde 2 capitole (1-2):

- **Capitolul 1** prezintă informații de bază despre bioîncapsulare; matrici utilizate ca materiale de imobilizare și diferitele tehnici de încapsulare.
- **Capitolul 2** prezintă date despre caracteristicile morfologice, clasificarea, metabolismul, efectele asupra sănătății și aplicațiile probioticelor.

Partea a doua cuprinde 4 capitole (3-6):

- **Capitolul 3** include date experimentale cu privire la încapsularea *Lactobacillus plantarum* cu suc verde de lucernă, ca prebiotic, în microsfele de alginat-chitosan și studierea comportamentului acestora în condiții gastrointestinale simulate.
- **Capitolul 4** conține date experimentale cu privire la influența matricii de încapsulare și a altor parametrii asupra capacității de supraviețuire a probioticului *Bifidobacterium lactis 300B*.
- **Capitolul 5** cuprinde date despre încapsularea și supraviețuirea *Bifidobacterium lactis 300B*, înainte și după încapsulare, aplicarea „coating”-ului și liofilizării.
- **Capitolul 6** descrie stabilitatea probioticului *Lactobacillus casei* liber și încapsulat, introdus în iaurt pe o perioadă lungă de depozitare.

O parte a acestei teze de doctorat a fost realizată la Brace GmbH - compania de microsfele, în Karlstein am Main, Germania, în colaborare cu Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj - Napoca, România, ca urmare a obținerii unui grant pus la dispoziție de Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU Fundația Germană de Mediu) pe perioada septembrie 2011 - februarie 2012.

REZULTATE EXPERIMENTALE

Bioîncapsularea este o tehnologie în curs de dezvoltare, folosită de 3 decenii și tot mai des acceptată într-o gamă largă de industrii precum cea farmaceutică, chimică, industria de cosmetice și produse alimentare, dar nu numai (Augustin and Sanguansri, 2003; Augustin et al., 2001; Nedovic et al., 2011; Poncelet et al., 2006; Vandamme et al., 2007).

Încapsularea probioticelor a devenit o tehnologie foarte atractivă, fiind adecvată pentru protecția probioticelor în mediul acid din stomac (Brachkova et al., 2010; Shahidi and Han, 1993), și asigurarea eliberării țintite în colon.

Pentru a îmbunătăți viabilitatea și rezistența probioticelor în timp și la temperaturi diferite, dar și pentru a asigura doza minimă necesară, după trecerea acestora prin tractul gastrointestinal superior și inferior, este necesară încapsularea probioticelor (Burgain et al., 2011). Imobilizarea celulelor se face, cel mai frecvent, în microsferă de alginat.

Marele potențial al celulelor probiotice este recunoscut și apreciat într-o gamă extrem de largă de domenii legate mai mult sau mai puțin cu sănătatea umană. Cu toate acestea, pentru o acțiune optimă a celulelor probiotice, este esențial ca acestea să fie expuse în condiții corespunzătoare de creștere și de asemenea, să fie protejate de eventuale condiții nefavorabile (pH acid, oxigen). Mai mult decât atât, în cazul celulelor probiotice, realizarea sau menținerea unei densități celulare ridicate, asigurarea activității celulelor pentru mai mult timp și reactivarea rapidă a acestora din produse, este deseori așteptată. Pentru asigurarea acestor deziderate se propune bioîncapsularea.

CAPITOLUL 1

MICROÎNCAPSULAREA *LACTOBACILLUS PLANTARUM* CU SUC VERDE DE LUCERNĂ, CA PREBIOTIC, ÎN MICROSFERE DE ALGINAT-CHITOSAN ȘI STUDIAREA COMPORTAMENTULUI ACESTORA ÎN CONDIȚII GASTROINTESTINALE SIMULATE

INTRODUCERE

Scopul acestui studiu a fost de a demonstra creșterea duratei de viață a probioticului *Lactobacillus plantarum*, încapsulat cu suc verde de lucernă (LGJ) (ca prebiotic), după încapsularea în matrice de alginat-chitosan.

Obiective

- Încapsularea celulelor probiotice *Lactobacillus plantarum*, împreună cu suc verde de lucernă (LGJ), într-o matrice de alginat, și testarea ratei lor de supraviețuire în mediu acid al sucului gastric simulat.
- Aplicarea unui înveliș (coating) de chitosan și evaluarea eliberării lor controlate în sucul intestinal simulat.

Diferite **metode** au fost aplicate pentru a demonstra eficacitatea încapsulării:

- Microscopia electronică de scanare (SEM) pentru vizualizarea structurii interne a microsferelor de alginat și a probioticului *L. plantarum* încapsulat.
- Viabilitatea celulelor probiotice încapsulate în microsferă de alginat-chitosan, înainte și după expunerea la sucul gastric simulat (30, 60, 90 și 120 de minute).
- Viabilitatea celulelor probiotice încapsulate în microsferă de alginat-chitosan, înainte și după expunerea la sucul intestinal simulat după 60, 90 și 120 de minute.

1.1. MATERIALE ȘI METODE

1.1.1. Materiale

Alginatul a fost achiziționat de la FMC, Norvegia, chitosanul, clorura de calciu, agarul nutritiv și bulionul MRS de la Merck (Germania). Toate materialele și soluțiile au fost sterilizate la 121 °C timp de 15 minute. Pentru sucurile gastrointestinale simulate au fost folosite pepsină, pancreatină și săruri biliare de la Bioaqua, România.

1.1.2. Sucul verde de lucernă - procedeu de obținere și caracterizare

Sucul verde de lucernă (LGJ) a fost obținut direct din lucernă proaspătă. Compoziția chimică a sucului verde de lucernă este prezentată în **Error! Reference source not found.** Sucul a fost utilizat imediat după obținere în experimentele propuse. Dintr-un kg de lucernă proaspătă s-au obținut aproximativ 300 ml LGJ. Procentul de cenușă în LGJ a fost de 5,3% (m/m). Sărurile din LGJ (PO_4^{3-} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+) sunt esențiale în procesul de cultivare a celulelor probiotice.

Tabel 1

Compoziția chimică a sucului de lucernă (LGJ)

	LGJ		LGJ
Carbohidrați [gl^{-1}]	8.28±0.1	NO_2^- [mg^{-1}]	<0.05
Acid lactic [gl^{-1}]	6.56±0.14	NO_3^- [mg^{-1}]	8.44±0.67
Acid acetic [gl^{-1}]	4.12±0.16	Cl^- [mg^{-1}]	1686.3±40.62
N_{tot} [gl^{-1}]	4.2±0.2	SO_4^{2-} [mg^{-1}]	638.6±27.75
P_{tot} [gl^{-1}]	4.2±0.2	PO_4^{3-} [mg^{-1}]	260.6±22.50
DM [%]	7.98±0.22	Na^+ [mg^{-1}]	98.66±1.52
ODM [%DM]	76.96±0.62	K^+ [mg^{-1}]	4639±16
pH	5.32±0.14	Mg^{2+} [mg^{-1}]	441.6±5.5
		Ca^{2+} [mg^{-1}]	2555.3±9

(Vodnar et al., 2010)

1.1.3. Tulpină probiotică: *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum a fost furnizat de compania Bioaqua, Romania. Cultivarea s-a realizat în bulion de carne MRS. Celulele probiotice au fost inoculate în 5 ml bulion MRS (Merck,

Germania) și incubate la temperatura de 37°C, 24h, după care a urmat cultivarea acestora în 95 mL bulion nutritiv și respectiv în bulion nutritiv îmbogățit cu LGJ (10%, respectiv 20%). Celulele probiotice au fost separate de bulion prin centrifugare la 3000 rpm timp de 5 min la temperatura de 4°C. După centrifugare acestea au fost spălate de două ori cu soluție sterilă de clorură de sodiu (8,5 g/L).

1.1.4. Obținerea microsferelor de alginat

Microîncapsulatorul Multinozzle Biotech, EncapBioSistems Inc. a fost utilizat pentru obținerea microsferelor. S-a utilizat o duză având dimensiunea de 350 μm, iar ca baie de întărire clorura de calciu (20 g/L). Condițiile utilizate au fost: 15 g/L alginat, 75 g/L celule probiotice (echivalentul a 10¹⁰ UFC/g) cu sau fără suc verde de lucernă (LGJ). Microsferele au fost lăsate în baia de întărire timp de 30 minute, apoi limpezite cu soluție sterilă de NaCl (8.5 g/L). După aceea au fost introduse, sub agitare continuă, în soluție de chitosan 1 g/L, timp de 30 minute, pentru aplicarea ”coating”-ului.

1.1.5. Caracterizarea morfologică a microsferelor

Caracterizarea morfologică a microsferelor s-a realizat cu ajutorul unui microscop electronic cu scanare E 302C. Proba a fost acoperită în aur, iar măsurătorile s-au realizat la amplificări de 100 și respectiv 2000.

1.1.6. Rezistența în mediu gastrointestinal. Prepararea sucului gastric și intestinal

Simularea sucului gastric, respectiv intestinal s-a realizat conform metodologiei descrise de Brinques și Ayub (Brinques and Ayub, 2011). Obținerea sucului gastric (SGJ) s-a realizat astfel: pepsina a fost suspendată în soluție sterilă de clorură de sodiu (0.5%, m/v) până la o concentrație finală de 3 g/L, pH-ul acesteia fiind ajustat la 1.5 cu soluție concentrată de HCl sau soluție sterilă 0.1 mol/L NaOH.

Sucul intestinal (SIJ) s-a obținut astfel: pancreatina a fost suspendată în soluție sterilă de clorură de sodiu (0.5%, m/v) până la o concentrație de 1 g/L, cu 4.5% săruri biliare. pH-ul a fost ajustat la valoarea de 7.4 cu soluție sterilă 0.1 mol/L NaOH.

Ambele soluții obținute au fost sterilizate prin filtrare cu ajutorul unui filtru, având dimensiunea porilor de 0.22 μm.

Toleranța probioticului *L. plantarum*, liber sau încapsulat a fost testată în conformitate cu metodologia descrisă în literatură (Brinques and Ayub, 2011).

1.1.7. Viabilitatea celulară

Determinarea numărului de celule probiotice viabile s-a realizat în triplicat înainte și după încapsulare și aplicarea ”coating”-ului. Celulele încapsulate au fost eliberate din microsferă cu ajutorul unei soluții de buffer cu pH 7.4 ± 0.2 , sub agitare continuă. Viabilitatea celulelor eliberate a fost determinată prin tehnica numărării pe plăci cu agar nutritiv după un interval de 72h de incubare la 37 °C. Rezultatele obținute (unitățile formatoare de colonii – UFC) au fost exprimate în \log_{10} UFC/ml.

1.1.8. Analiza statistică

Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul programului Graph Prism Version 5.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA).

1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

1.2.1. Procedeele de obținere a sucului verde de lucernă

Dintr-un kg de lucernă proaspătă s-au obținut aproximativ 300 ml LGJ. Procentul de cenușă în LGJ a fost de 5,3% (g/g).

1.2.2. Structura microsferelor cu *L. plantatum*

Prin microscopie electronică de scanare structura internă a microsferelor de alginat care conțin *L. plantarum* pot fi observate (**Fig. 1**), la amplificări diferite.

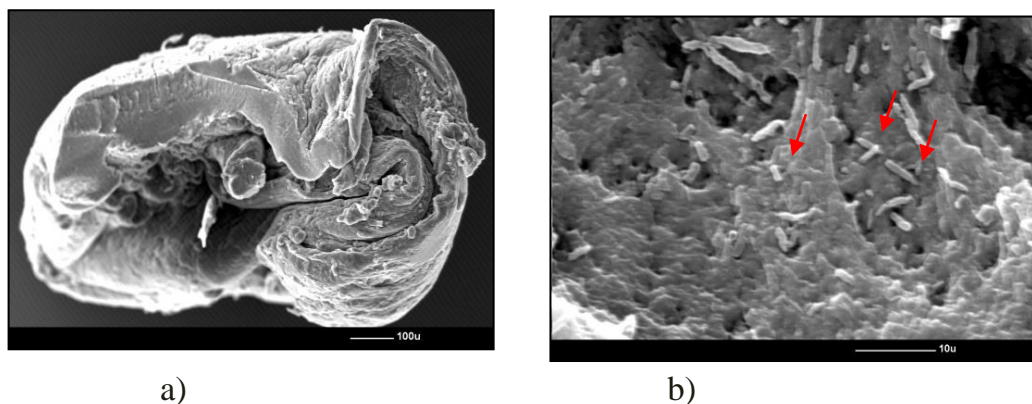


Fig. 1 Imagine SEM a microsferelor ce conțin *L. plantarum*. Amplificare a) joasă (x 100) și b) înaltă (x 2000).

Săgețile (Fig. 1b) indică celulele probiotice inserate în matricea de alginat. Media dimensiunii microsferelor obținute a fost de $1110.5 \pm 12.7 \mu\text{m}$. Diametrul mediu al microsferelor acoperite (coated) cu chitosan a fost semnificativ ($p < 0,05$) mai mare ($1269.5 \pm 14.4 \mu\text{m}$) decât microsferele fără "coating".

1.2.3. Supraviețuirea celulelor probiotice libere și încapsulate, în suc gastric

În Fig. 2 sunt reprezentate rezultatele supraviețuirii probioticului *L. plantarum* în suc gastric (pH 1.5, 37 °C) înainte și după expunere timp de 30, 60 și 120 minute. Capacitatea de supraviețuire, exprimată ca \log_{10} UFC/ml, a probioticului *L. plantarum* în SGJ arată diferite comportamente în corelație cu prezența sau absența LGJ, concentrația acestuia și încorporarea în microsfere de alginat-chitosan.

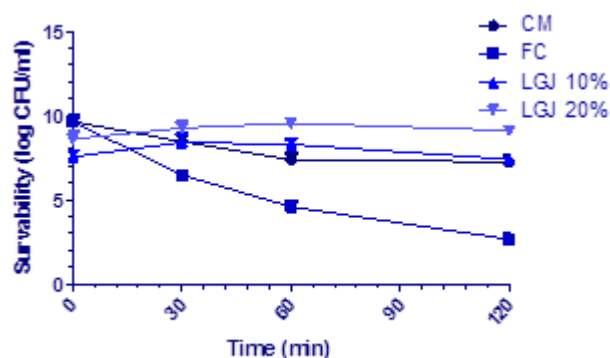


Fig. 2 Viabilitatea probioticelor *L. plantarum* în suc gastric (pH 1.5, 37°C) înainte și după expunere timp de 30, 60 și 120 minute (●) CM- *L. plantarum* în microsfere de alginat-chitosan; (■) FC- probiotic neîncapsulat; (▲) LGJ 10% - *L. plantarum* în microsfere de alginat-chitosan co-încapsulat cu 10% suc verde de lucernă; (▼) LGJ 20% - *L. plantarum* în microsfere de alginat-chitosan co-încapsulat cu 20% suc verde de lucernă.

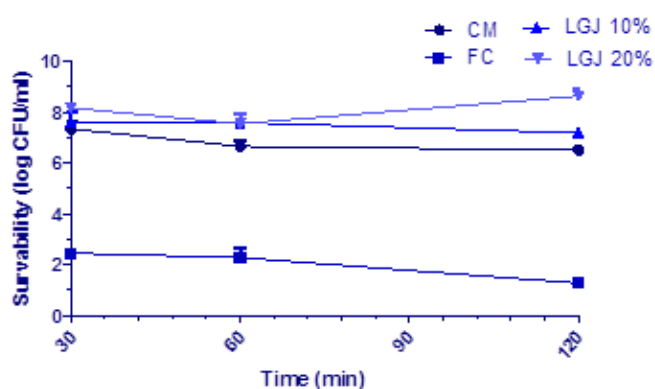


Fig. 3 Viabilitatea probioticelor *L. plantarum* în suc intestinal (pH 7,4) înainte și după expunere timp de 30, 60 și 120 minute (●) CM *L. plantarum* în alginat-chitosan microsfere; (■) FC probiotice neîncapsulate; (▲) LGJ 10% *L. plantarum* în microsfere de alginat-chitosan co-încapsulat cu 10% LGJ; (▼) LGJ 20% *L. plantarum* în microsfere de alginat-chitosan co-încapsulat cu 20% LGJ.

Fig. 2 include rezultatele de supraviețuire a celulelor probiotice libere (FC), a celor încapsulate în matrice de alginat-chitosan (CM) și *L. plantarum* încapsulat, cu sau fără LGJ, după expunerea la suc gastric simulat (SGJ) la pH 1,5 timp de 0, 30, 60 și 120 de minute.

Capacitatea de supraviețuire, exprimată ca (\log_{10} UFC/ml) a probioticului *L. plantarum* în SGJ arată diferite comportamente în corelație cu prezența sau absența sucului verde de lucernă (LGJ), cu concentrația acesteia și încorporarea în microsferă de alginat-chitosan. Rata de scădere a celulelor viabile microîncapsulate în comparație cu celule libere a fost cu 10^2 UFC/ml după 30 de minute în SGJ și, respectiv, 10^5 UFC/ml după 120 de minute în SGJ. Rata de supraviețuite a celulelor neîncapsulate (FC) a fost semnificativ mai mică ($p < 0,05$) în comparație cu celulele probiotice încapsulate (CM).

De asemenea s-au obținut diferențe nesemnificative între probele de microsferă alginat-chitosan și cele cu alginat-chitosan și LGJ 10%. Totuși probele de microsferă de alginat-chitosan cu LGJ 20% au dovedit cea mai bună protecție pe întreg intervalul de timp propus.

1.2.4. Supraviețuirea celulelor probiotice libere și încapsulate, în suc intestinal

În Fig. 3 este prezentat comportamentul celulelor probiotice *L. plantarum* libere și încapsulate după expunere la suc intestinal simulat (SIJ) (pH 7,4), precum și efectul adaosului de LGJ.

Densitatea celulelor probiotice libere după incubare în SIJ, după 90 de minute de expunere, a fost cu 10^4 UFC/ml, mai mică decât nivelul terapeutic minim acceptat (10^7 UFC/ml). Viabilitatea medie inițială de $0,2 \times 10^3$ UFC/ml a fost redusă la $1,3 \times 10^2$ UFC/ml după 60 de minute, iar numărul mediu viabil a fost redus la mai puțin de 2×10 UFC/ml după 120 de minute de incubare. Supraviețuirea probioticului *L. plantarum* microîncapsulat după expunere în SIJ, după 60 și 120 de minute a fost 92,57 %, respectiv 91,43 % din numărul de celule viabile la momentul începerii incubării (minutul 30). Celulele probiotice microîncapsulate în alginat-chitosan au fost menținute la nivelul terapeutic minim acceptat după 60 minute de expunere în SIJ, dar după 120 minute numărul celulelor viabile a fost sub această valoare.

Cea mai eficientă formulare pentru protejarea celulelor probiotice în SIJ a fost cea încapsulată în matrice de alginat-chitosan cu 20% LGJ.

Sultana și colab. (Sultana et al., 2000) au raportat că încapsularea celulelor probiotice în alginat nu le protejează în mod eficient de aciditatea ridicată. Chiar și așa, mai multe studii au demonstrat că supraviețuirea probioticelor microîncapsulate a fost îmbunătățită în microsferă de alginat în timpul expunerii la suc gastric simulat (Albertini et al., 2010; Anal and Singh, 2007; Annan et al., 2008; Brinques and Ayub, 2011; Krasaekoopt et al., 2004). Cu atât mai mult, un strat de chitosan aplicat microsferelor de alginat asigură o protecție mai bună pentru celulele probiotice încorporate (Chavarri et al., 2010), pentru că, în momentul imersării microsferelor în SIJ are loc o reacție de schimb ionic (Murata et al., 1999).

Un efect similar a fost observat în studiul de față, deși studiile raportate în literatură nu prezintă consecvență în ceea ce privește procedura de încapsulare raportată.

1.3. CONCLUZII

Studiul rezumă co-încapsularea *Lactobacillus plantarum* cu suc verde de lucernă, în concentrații diferite, în comparație cu celulele probiotice libere, și supraviețuirea acestora după trecerea pe mediul gastrointestinal simulat.

Concluzile capitolului sunt:

- Sucul verde de lucernă a fost obținut cu succes în laborator (randament de 30%), cu un procentaj de cenușă de 5,3%.
- Dimensiunea microsferelor ce conțin *Lactobacillus plantarum* variază de la 1110 μm (pentru microsferă fără înveliș/coating) la 1269 μm (pentru cele învelite cu chitosan).
- Imaginea SEM a arătat structura morfologică a microsferelor de alginat care conțin *Lactobacillus plantarum*. Celulele probiotice au putut fi observate în matricea de alginat.
- După expunerea la SGJ, cel mai înalt nivel de supraviețuire a fost observat pentru eșantionul în care *Lactobacillus plantarum* a fost încorporat cu LGJ 20%.
- Cea mai eficientă formulă pentru protecția celulelor probiotice la trecerea în SIJ fost cel cu 20% LGJ după 60 minute de incubare.

CAPITOLUL 2

INFLUENȚA MATRICILOR FOLOSITE PENTRU ÎNCAPSULAREA PROBIOTICELOR ASUPRA PROPRIETĂȚILOR MICROSFERELOR ȘI A VIABILITĂȚII CELULELOR PROBIOTICE

INTRODUCERE

Scopul acestui studiu a fost găsirea formulei optime pentru încapsularea *Bifidobacterium lactis 300B* în microsferă de alginat, cu scopul de a obține proprietăți fizice și biochimice care să susțină viabilitatea celulelor încapsulate. Pentru aceasta s-au utilizat șapte tipuri de polimeri: trei tipuri de celuloză, două tipuri de amidon, dextrină și pululan.

Obiective

Ne-am propus să comparăm producția, eficiența încapsulării și proprietățile micrometrice ale microsferelor rezultate în urma încapsulării *Bifidobacterium lactis 300B* în microsferă de tip alginat cu cei șapte polimeri diferiți propuși.

S-au aplicat următoarele **proceduri**:

- Liofilizarea microsferelor pentru o durată de depozitare îndelungată.
- Determinarea viabilității celulelor probiotice după liofilizare.
- Determinarea supraviețuirii probioticului încapsulat și liofilizat după 3, 6, 9 și 15 zile la temperatura camerei și respectiv la 4 °C.

2.1. MATERIALE ȘI METODE

2.1.1. Polimeri utilizați ca și material de umplere

Alginatul Mangel GMB a fost achiziționat de la FMC, amidonul BR-07 și amidonul BR-08 de la Brace, dextrina cristalină de la Sigma, Na-CMC de la Dow Chemicals, hidroxipropil metilceluloza de la Harke Pharma, celuloza microcristalină Viva-pur 105 (MCC) de la Rettenmayer și pululan de la Hayashibara. Acești polimeri au fost utilizați pentru obținerea a șapte tipuri diferite de microsferă de alginat. Clorura de calciu a fost achiziționată de la Brenntag, fosfatul de sodiu de la Merck, mediu selectiv agar pentru

Bifidobacteria și peptona de la Sigma-Aldrich. Toate soluțiile și materialele au fost sterilizate la 121 °C timp de 15 min.

2.1.2. Pregătirea microorganismelor, mediul și condițiile de creștere

Bifidobacterium lactis 300B a fost probioticul utilizat, sub formă de pulbere liofilizată achiziționată de la Howaru, Germania. Înainte de fiecare experiment s-a realizat un test al viabilității celulelor probiotice.

2.1.3. Încapsularea *B. lactis 300B* în microsferă de alginat

S-a utilizat 75 g/L, *B. lactis 300B*, 15 g/L alginat (FMC, Norvegia) și 15 g/L din fiecare material de umplere discutat la 2.1.1. Pentru obținerea microsferelor s-a utilizat un Sferizator M, tip 2002SP-AE5-D0 la Brace GmbH Germania. Microsferele obținute au fost lăsate 30 minute în baia de întărire CaCl₂ 40 g/L (Brenntag, Australia). În Tabel 2 sunt prezentate formulele de încapsulare a probioticului *B. lactis 300B* și codificările acestora.

Tabel 2

Formulele de încapsulare a probioticului *Bifidobacterium lactis 300B* și codificările acestora

	Material de umplere	Codificare
Microsfere obținute din alginat 1.5% (m/v) și diferite materiale de umplere 1.5% (m/v)	HPMC	AHPMC
	Na CMC	ACMC
	MCC	AMCC
	Amidon BR-07	AS07
	Amidon BR-08	AS08
	Dextrină	AD
	Pululan	AP

2.1.4. Proprietățile mixului de alginat – material de umplere

Densitatea mixului alginat – material de umplere a fost calculată conform formulei:

(1) $\rho = m/V$ g/cm³ unde (m) este masa și (V) reprezintă volumul.

Vâscozitatea s-a determinat cu ajutorul vâscozimetrului HAAKE VT-02 (ThermoFisher, Germania) la 23 ± 1°C. Tensiunea de suprafață a fost considerată aceeași pentru toate cele șapte probe, iar valoarea acesteia a fost luată din literatură (Chan et al., 2011a).

2.1.5. Eficiența încapsulării probioticului *B. lactis* 300B

Eficiența încapsulării *B. lactis* în microsferelor proaspăt obținute a fost determinată conform metodologiei descrise de literatură (Sandoval-Castilla et al., 2010) cu mici modificări după cum urmează:

(1) Eficiența încapsulării = $(a \times F/b) \times 100$ (UFC/g), unde "a" reprezintă UFC/g în microsferelor, și "b" este UFC/g în mixul de alginat cu biopolimer iar "F" este factorul de sfericitate $F=0.70$ (Aste and Weaire, 2008).

2.1.6. Determinarea dimensiunii și formei microsferelor

Dimensiunea microsferelor a fost determinată conform metodologiei lui Chan și colab. (Chan et al., 2011b).

Diametrul teoretic al picăturii desprinse: $D_{I(T)}$ (mm): (2) $D_{I(T)} = (6d_T\gamma/\rho g)^{1/3}$, unde d_T este diametrul duzei (mm); γ este tensiunea de suprafață (g/s^2); ρ este densitatea (g/mm^3); și g este accelerația gravitațională (mm/s^2).

Diametrul corect al picăturii desprinse, $D_{I(C)}$ (mm): (3) $D_{I(C)} = k_{LF} * D_{I(T)}$, unde k_{LF} este factorul de pierdere în lichid, $k_{LF} = 0.98 - 0.04d_T$.

Diametrul corect al microsferelor de alginat după gelifiere, $D_{b(C)}$ (mm): (4) $D_{b(C)} = k_{SF(gelifiere)} * D_{I(C)}$, unde k_{SF} este factorul de contractare atribuit procesului de gelifiere, considerat $k_{SF(gelifiere)} = 0.88$ (Chan et al., 2011b).

Reducerea dimensiunii după liofilizare a fost calculată conform formulei: (5) $k_{SF(liofilizare)} = (D_b - D_{b(liofilizare)})/D_b$, și $k_{SF(liofilizare)}$ este factorul de contractare atribuit procesului de liofilizare; D_b este diametrul microsferelor înainte de liofilizare, obținut conform metodologiei descrise mai sus (mm); și $D_{b(liofilizare)}$ diametrul microsferelor obținute după liofilizare (mm).

2.1.7. Determinarea formei microsferelor

Forma microsferelor a fost cuantificată cu ajutorul factorului de sfericitate (SF), dat de următoarea ecuație: Factor de sfericitate (6) $(SF) = (d_{max} - d_{min})/(d_{max} + d_{min})$, unde d_{max} este diametrul cel mai mare și d_{min} este cel mai mic diametru perpendicular pe d_{max} . Pentru fiecare determinare s-au utilizat douăzeci de microsferelor.

2.1.8. Liofilizarea microsferelor

Microsferele obținute au fost tratate termic la -18°C după care au fost liofilizate utilizând liofilizatorul VaCo 5, Zirbus (Germania) cu următorii parametri: -50°C , 0.05 mbar timp de 24h. Probele au fost analizate imediat și la intervale de 3, 6, 9 și 15 zile de depozitare la $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, respectiv $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.1.9. Determinarea densității în vrac, tasată și capacitatea de curgere

Densitatea în vrac (ρ_{BD}) a microsferelor obținute a fost determinată cu ajutorul unui cilindru gradat în care a fost introdusă o cantitate cunoscută de microsfere (mp). Aceasta a fost calculată cu ajutorul formulei:

$$(7) \rho_{\text{BD}} = m_p / v_b \text{ unde } (m_p) \text{ este masa, iar } (v_b) \text{ volumul.}$$

Densitatea tasată (ρ_{TD}) a fost calculată ca și densitatea în vrac, cu mențiunea că cilindrul a fost supus vibrațiilor până s-a obținut un volum constant (v_t).

Raportul Hausner a microsferelor a fost determinat conform formulei: (8) Hausner ratio = $\rho_{\text{TD}} / \rho_{\text{BD}}$. Acest raport este un parametru care influențează invers proporțional capacitatea de curgere a microsferelor.

2.1.10. Viabilitatea *B. lactis 300B* înainte și după încapsulare și liofilizare

Viabilitatea *B. lactis 300B* înainte și după încapsulare și liofilizare a fost determinată folosind metoda numărării pe plăci de agar selectiv BSM (Sigma-Aldrich, Germania). După dizolvarea microsferelor în citrat de sodiu (20 g/L), pH=7.3, s-au realizat diluții succesive cu ser fiziologic (8.5 g/L). Din ultimele trei diluții, s-a utilizat câte 1 ml pentru incubare pe placa Petri. Operațiunile s-au efectuat în triplicat. După incubare timp de 72 h la 37°C în recipiente anaerobe (Sigma-Aldrich, Germania) s-a calculat numărul de unități formatoare de colonii (UFC). Pentru calculele ulterioare rezultatele au fost exprimate în \log_{10} UFC/g.

Supraviețuirea probioticului *B. lactis* în fiecare probă liofilizată a fost determinată cu ajutorul formulei: (9) Supraviețuirea = (n/n_0) , unde “ n_0 ” reprezintă numărul de celule probiotice viabile per gram microsfere înainte de liofilizare, iar “ n ” reprezintă numărul de celule probiotice viabile din microsferele liofilizate, determinat imediat după liofilizare (Simpson et al., 2005).

2.1.11. Testul stabilității microsferelor liofilizate

Stabilitatea celulelor probiotice în microsferele liofilizate, după 3, 6, 9 și 15 zile de depozitare la temperatura camerei, respectiv la 4 °C, a fost determinată prin calculul raportului dintre UFC/g microsfere depozitate la intervalele amintite / UFC/g microsfere imediat după liofilizare.

2.1.12. Analiza statistică

Valorile medii și deviația standard au fost calculate, din date obținute în triplicat, cu ajutorul programului Graph Prism Versiunea 4.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Pentru determinarea dimensiunilor, calculele s-au realizat în Microsoft Excel 2010.

2.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

2.2.1. Randamentul de încapsulare și eficiența încapsulării

În vederea producției la scară industrială, s-au testat diverși parametri de producție pentru fiecare tip de combinație de polimeri în parte. S-a concluzionat că producția de microsfere, în ceea ce privește cantitatea și calitatea, este influențată de tipul de polimer folosit alături de alginat, ca și material de umplere. Producția de 600 g/h, valoarea medie obținută în studiul de față, este un rezultat ușor realizabil. Încercări ulterioare pentru a obține valori de producție mai mari, care să varieze de la 3.6 kg/h la 10 kg/h, pot fi obținute cu ușurință, fără modificări considerabile. După cum poate fi remarcat în Fig. 4, cea mai mare rată de producție este observată pentru probele AS08, AP și AS07, în această ordine.

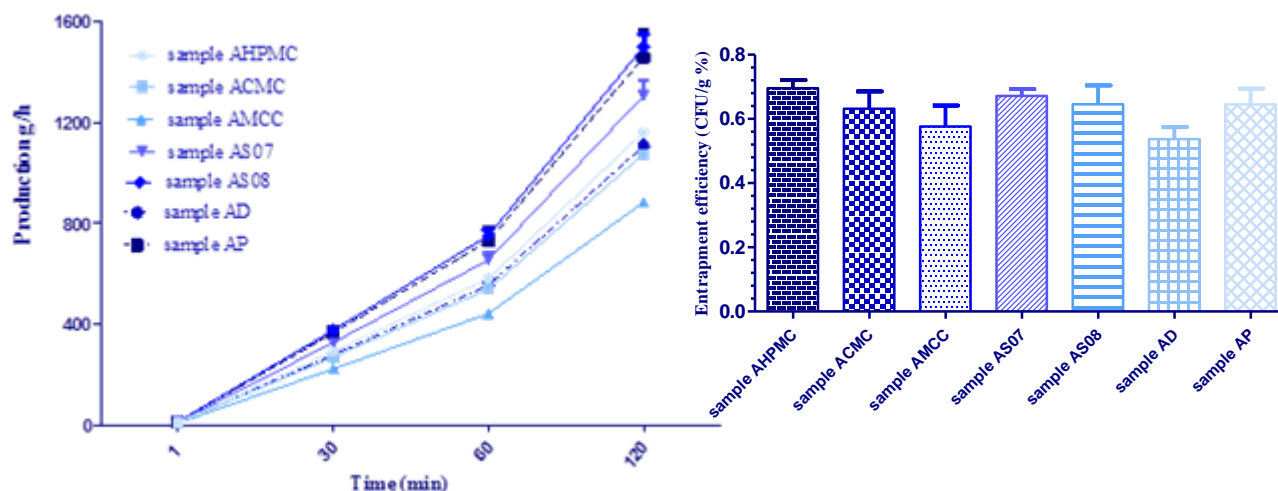


Fig. 4 Producția (g/h) microsferelor ce au ca matrice principală alginatul în combinație cu diverși polimeri. ((●) proba AHPMC, (■) proba ACMC, (▲) proba AMCC, (▼) proba AS07, (◆) proba AS08, (◻) proba AD, (▣) proba AP). (pentru abrevieri vezi

Error! Reference source not found.).

Cantitatea de microsferă produse pentru probele AHPMC a fost de 580 g/h, ACMC- 537,4 g/h și AD-552,4 g/h, valori similare, în timp ce proba AMCC- 441 g/h, a demonstrat cea mai mică rată de producție.

O capacitate de încapsulare ridicată a fost observată la toate cele șapte probe (Fig. 5), cu valori cuprinse între 57.20% și 69.96%. Studiile de specialitate (Jyothi et al., 2010; Reid et al., 2005) corelează eficiența încapsulării cu pierderile de viabilitate în microsferă existentă imediat după încapsulare. Tipul polimerului utilizat influențează eficiența încapsulării prin factorul de contractare și prin legăturile lanțurilor polimerice. Cea mai mare eficiență a fost înregistrată la probele AHPMC, AP și AS07. Datorită proprietăților fizico-chimice obținute în cazul microsferelor ce conțin hidroximetil propilceluloză, pululan și amidon, acțiunea alginatului a fost susținută și ameliorată. Microsferele la care s-a utilizat ca materiale de umplere celuloza microcristalină (proba AMCC) și respectiv dextrina (proba AD) au înregistrat cele mai scăzute valori ale eficienței de încapsulare. Restul probelor, respectiv cele în care s-au utilizat celelalte două tipuri de celuloză și amidonul BR-08 au înregistrat tendințe similare. Rezultatele obținute cu privire la eficiența încapsulării pentru probele în care s-au utilizat diferitele tipuri de celuloză și amidon sunt în acord cu cele raportate anterior de Nochos și colab. (Nochos et al., 2008) și Sultana și colab. (Sultana et al., 2000).

2.2.2. Proprietățile mixului alginat-material de umplere. Dimensiunea și forma microsferelor

Media dimensiunii celor șapte tipuri de microsferă a variat între 1,054 și 1,066 mm. După cum poate fi observat în Tabel 3, procesul de formare a picăturii și a celui de gelifiere prezintă tendințe similare pentru toate probele, în ceea ce privește dimensiunea. Cu atât mai

mult se poate observa o diminuare a microsferelor după gelifiere, în comparație cu picătura desprinsă.

Tabel 3

Densitatea și vâscozitatea amestecului, dimensiunea duzei și diametrele calculate pentru fiecare probă

Probe	Densitatea (g /cm ³)	Vâscozitatea (mPa·s)	Diametrul nozzle (mm)	Diametrul teoretic al picăturii desprinse (mm)	Diametrul corectat al picăturii desprinse (mm)	Diametrul corectat al microsferelor după gelifiere (mm)	Diametrul experimental al microsferelor după gelifiere (mm)
AHPMC	1,037±0.01	190±11.8	0.3	1,2248	1,1907	1,099	1,0668
ACMC	1,040±0.01	490±20.6	0.3	1,2061	1,1765	1,084	1,0539
AMCC	1,039±0.015	260±23.2	0.3	1,2166	1,1827	1,092	1,0596
AS07	1,038±0.018	255±17.61	0.3	1,2169	1,183	1,090	1,0599
AS08	1,027±0.019	250±18.9	0.3	1,2208	1,1868	1,095	1,0633
AD	1,019±0.01	248±16.8	0.3	1,224	1,1899	1,097	1,0661
AP	1,017±0.014	310±12.4	0.3	1,2158	1,1819	1,091	1,0589

Valorile reprezintă medii (n =3) ± deviația standard

Factorii responsabili pentru influența dimensiunii microsferelor sunt: vâscozitatea soluției de polimeri, diametrul duzei folosite și distanța dintre punctul de ieșire al picăturii și baia de întărire (Anal et al., 2003; Anal and Singh, 2007; Anal and Stevens, 2005) și metoda de încapsulare folosită (Grabnar and Kristl, 2011). În studiul de față s-a utilizat același tip de duză (nozzle). Se poate totuși remarca o relație între vâscozitatea soluției de polimer și dimensiunea microsferelor obținute. Proba AHPMC, cea mai puțin vâscoasă dintre probe, cu o vâscozitate de 190 mPa a prezentat cel mai mare diametru, 1.0668 mm. Acest tip de corelație, între vâscozitatea soluției de polimer și dimensiunea microsferelor este susținută și de alte studii (Chan et al., 2011b; Chandramouli et al., 2004). Tendințe similare au putut fi remarcate pentru probele AD, AS07, AS08, ACMC și AP, fără diferențe semnificative nici pentru valorile vâscozităților, nici pentru diametrele microsferelor.

În procedeul de obținere a microsferelor, picătura este formată cu ajutorul unui sistem de vibrare. După ce picătura a fost formată, aceasta este desprinsă cu ajutorul vibrației și ajunge în baia de întărire unde leagă ioni, fenomen atribuit efectului de contracție ce apare în

procesul de formare a gelului. Diametrele microsferelor obținute experimental, după gelifiere au fost relativ apropiate cu cele determinate prin calculele matematice (Tabel 3).

Studii anterioare (Donati et al., 2005) au arătat faptul că, factorul de contractare, poate fi utilizat pentru a corecta diametrul microsferelor după gelifiere. Chan și colab. (Chan et al., 2011a) au demonstrat că un amestec de polimeri cu o vâscozitate redusă a generat un factor de contractare ridicat. În conformitate cu ce a fost amintit în literatură, această tendință a fost remarcată și în studiul de față (

Fig. 6). Factorul de contractare cu valoarea cea mai ridicată a putut fi observat la probele AHPMC și AD, probele a căror vâscozitate a mixului de polimeri a fost cea mai scăzută. Factorul de contractare cu cea mai scăzută valoare a fost atribuit probelor ACMC și AP, vâscozitatea mixului de polimeri fiind invers proporțională cu acesta (Nienaltowska et al., 2010).

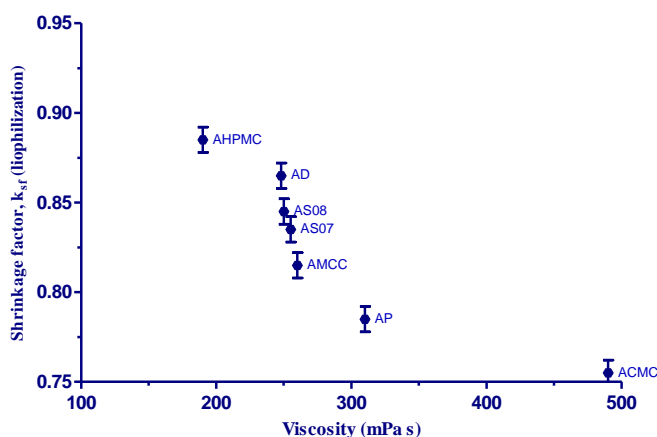


Fig. 6 Efectul vâscozității și factorul de contractare asupra microsferelor de alginat liofilizate.

Forma microsferelor a fost determinată cu ajutorul factorului de sfericitate (SF). O sferă are o valoare a factorului de sfericitate egală cu 1, în timp ce obiectele alungite au valori ale factorului de sfericitate ce tind spre 0. În conformitate cu cele susținute de Goh și colab. (Goh et al., 2012), o concentrație ridicată a polimerului utilizat în procesul de încapsulare induce o sfericitate ridicată a microsferelor obținute. În studiul de față, toate microsferile obținute au prezentat forme sferice indiferent de tipul de polimer folosit alături de alginat. Procesul de liofilizare a indus o deformare a structurii microsferelor, deformare

cauzată de sublimarea apei din matricea de polimer. Acest fapt a dus la obținerea de "microsfere" cu formă neregulată și nepredictibilă, fapt subliniat și de alte studii (Chan et al., 2011b; Rassis et al., 2002; Zohar-Perez et al., 2004). Cu toate acestea, s-a putut remarca o atenuare a deformării care a fost corelată cu tipul de polimer folosit alături de alginat. În Tabel 4 sunt prezentate valorile factorului de sfericitate a microsferelor liofilizate.

Tabel 4

Factorul de sfericitate (SF) a microsferelor liofilizate

Proba	AHPMC	ACMC	AMCC	AS07	AS08	AD	AP
(SF)	0.203±0.003	0.149±0.008	0.092±0.009	0.157±0.005	0.154±0.005	0.183±0.003	0.103±0.004

Valorile sunt medii (n =3) ± deviația standard

2.2.3. Densitatea în vrac, tasată și capacitatea de curgere a microsferelor liofilizate

În general, eficiența încapsulării este considerată un parametru al calității microsferelor uscate. Cu toate acestea, alți parametri ai calității microsferelor liofilizate sunt densitatea în vrac, densitatea tasată și raportul Hausner care relevă capacitatea de curgere (Kennedy and Panesar, 2006). Tabel 5 descrie rezultatele acestor parametri.

Valorile densității în vrac au variat de la 0.18 la 0.28 g/cm³. După cum este foarte bine cunoscut, un produs uscat cu o valoare ridicată a densității în vrac ocupă un volum mai redus decât un produs ce are o valoare mică a densității în vrac.

Densitatea tasată este densitatea în vrac după aplicarea unui proces de compactare. Valorile obținute pentru această densitate au variat de la 1.20 la 0.32 g/cm³. Cele mai ridicate valori ale densității tasate s-au înregistrat pentru probele AMCC, AP, ACMC și AS07. Pentru toate probele densitatea tasată a fost mai mare decât cea în vrac. S-a putut remarca, de asemenea o corelație între densitățile probelor și vâscozitatea amestecului de polimeri din care s-au obținut microsferele. Această corelație este susținută și de literatură (Chan et al., 2011b).

Tabel 5

Densitatea în vrac, densitatea tasată și capacitatea de curgere a microsferelor liofilizate obținute din alginat și material de umplere (pentru abrevieri vezi Tabel 2)

Probe	Densitatea în vrac (g/cm ³)	Densitatea tasată (g/cm ³)	Capacitatea de curgere (kg/s)
AHPMC	0.18 ± 0.015	0.20 ± 0.013	1.06 ± 0.003
ACMC	0.26 ± 0.014	0.28 ± 0.019	1.07 ± 0.005
AMCC	0.27 ± 0.016	0.32 ± 0.021	1.16 ± 0.008
AS07	0.25 ± 0.019	0.26 ± 0.017	1.09 ± 0.002
AS08	0.20 ± 0.014	0.21 ± 0.016	1.13 ± 0.001
AD	0.19 ± 0.013	0.21 ± 0.015	1.09 ± 0.004
AP	0.28 ± 0.011	0.30 ± 0.019	1.06 ± 0.006

Valorile reprezintă medii (n =3) ± deviația standard

Raportul Hausner poate fi definit ca fiind raportul dintre densitatea tasată și cea în vrac (Kennedy and Panesar, 2006).

O valoare ridicată a raportului Hausner indică faptul că materialul nu are capacitatea de curgere ușoară. O valoare a raportului mai mică de 1.5 a fost folosită pentru a indica o capacitatea bună de curgere (Thalberg et al., 2004). În studiul de față probele au demonstrat un potențial ridicat de curgere liberă, înregistrând valori ale raportului Hausner între 1.07 și 1.16. Cea mai mare valoare a fost observată în dreptul probei AMCC, demonstrând o frecare interparticulară ridicată. Cele mai scăzute valori ale raportului s-au înregistrat la probele AHPMC și AP, dar nu au fost diferențe semnificative între cele șapte probe. Chan și colab. (Chan et al., 2011b) au corelat valorile raportului Hausner cu concentrația polimerului utilizat ca și material de umplere. În studiul prezent diferențele nesemnificative pot fi atribuite faptului că nu s-au înregistrat diferențe notabile în ceea ce privește dimensiunea microsferelor obținute.

2.2.4. Supraviețuirea *B. lactis 300B* în microsferele obținute

Tehnica de încapsulare influențează capacitatea de încapsulare. Cantitatea de celule probiotice încapsulate a fost calculată cu ajutorul fracției ce are ca numărător numărul de celule probiotice în microsferă imediat după încapsulare și ca numitor numărul de celule probiotice din mixul de polimeri.

În conformitate cu datele prezentate în

Fig. 7, supraviețuirea celulelor probiotice după procesul de încapsulare a scăzut pentru toate cele șapte probe. Se poate remarca o influență a matricilor folosite asupra viabilității, înregistrându-se valori diferite (exprimate în \log_{10} UFC/g). Procedeele de încapsulare a fost același pentru toate cele șapte probe. În literatură (Rodriguez-Huezo et al., 2007), este raportat faptul că, în procesul de încapsulare se poate obține o rată a viabilității ridicată pentru probioticul *B. lactis* prin protecția imediată a acestuia împotriva acțiunii oxigenului. Proprietatea specifică a polimerului pululan de a forma un film protector ce asigură această protecție este raportată de literatură (Leathers, 2003; Singh et al., 2008).

Această afirmație susține rezultatele obținute în studiul de față.

Fig. 7 prezintă rata de supraviețuire a celulelor probiotice, determinată în condiții similare pentru toate cele șapte probe. Se poate observa că proba AP, unde polimerul pululan a fost utilizat, înregistrează cea mai ridicată valoare 10^{13} UFC/g imediat după încapsulare. Microsferele unde HPMC (hidroxipropil metilceluloza) a fost utilizată, prezintă, după proba AP, cea mai ridicată valoare 10^{12} UFC/g în comparație cu media celorlalte probe 10^9 UFC/g.

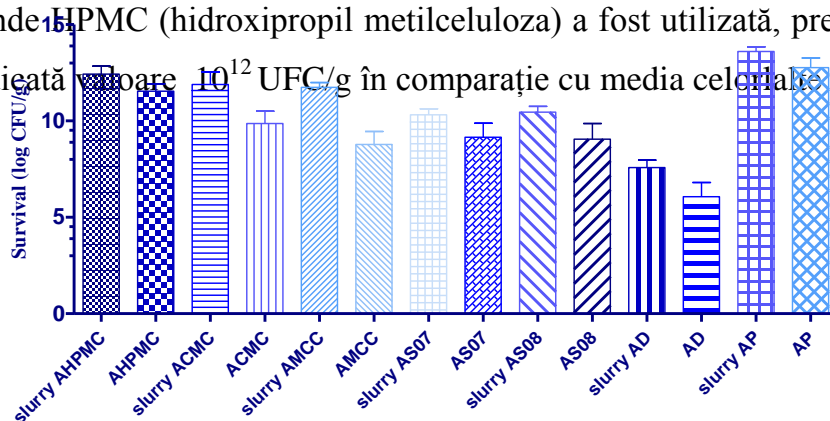


Fig. 7 Viabilitatea *B. lactis* 300B în suspensie și în cele șapte tipuri de microsfere de alginat, exprimată în \log_{10} UFC/g.

Numărul celulelor probiotice viabile din microsferelor proaspăt obținute influențează numărul de celule viabile din produsul final. Unele studii (Capela et al., 2007; Chan et al., 2011b) corelează viabilitatea celulelor încapsulate, imediat după procesul de încapsulare, cu proprietățile fizice ale microsferelor. Rezultatele acestui studiu, cad undeva la mijloc, pentru că probele HPMC, AP și AS08 (în această ordine) au înregistrat cele mai bune valori ale proprietăților fizice, în timp ce, cea mai bună rată de supraviețuire după procesul de încapsulare a fost observată la proba AP. În acest caz, proprietatea polimerului pululan de a conferi protecție față de mediul extern (ex. oxigen) a avut o influență mai mare decât proprietățile fizice ale microsferelor (ex. sfericitate, dimensiune).

2.2.5. Viabilitatea după liofilizare

După liofilizare, reducerea greutateii microsferelor a fost mai mare de 92% pentru toate probele. Pentru că cele mai bune rezultate s-au observat la probele AP și AHPMC, în continuare s-a determinat rata de supraviețuire a probioticului *B. lactis 300B* doar în microsferelor de tip AP și AHPMC liofilizate.

Procesele de deteriorare apărute în urma liofilizării sunt cauzate de cristalele de gheață mari care sparg membrana celulelor. Acest proces afectează negativ viabilitatea probioticului în procesul de liofilizare, fapt ce poate fi observat în Fig. 8.

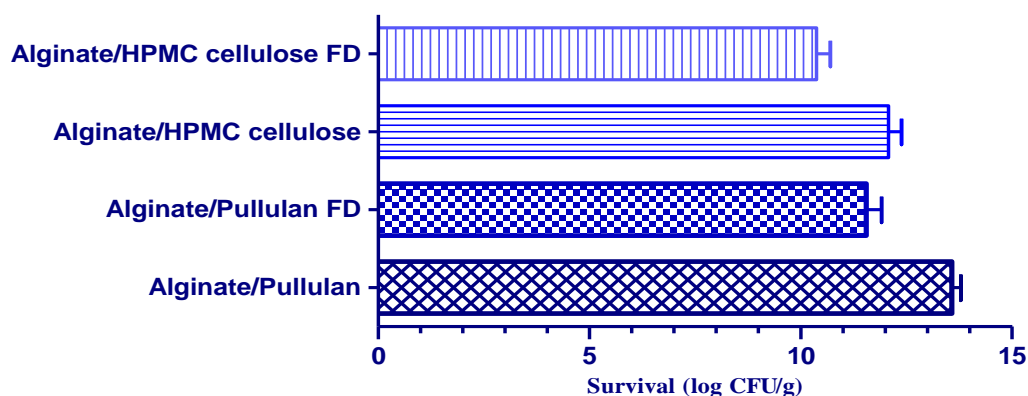


Fig. 8 Viabilitatea probioticului *B. lactis 300B* înainte și după aplicarea liofilizării pentru probele AHPMC (alginat-celuloză HPMC) și AP (alginat-pululan).

Numărul de celule probiotice viabile încapsulate și liofilizate s-a determinat prin dividerea numărului de celule viabile după liofilizare la numărul de celule viabile inițial. La ambele probe s-a observat o rată ridicată de supraviețuire a probioticului *B. lactis*. Această rată ridicată de supraviețuire se datorează peretelui celular și membranei celulelor probiotice ce aparțin *Bifidobacterium* (Carvalho et al., 2004). S-a înregistrat o pierdere a viabilității de 14.16% și 17.98% pentru probele AHPMC, respectiv AP imediat după procesul de liofilizare. În procesul de liofilizare a celulelor probiotice aparținând probioticului *Bifidobacteria*, conform literaturii (Capela et al., 2006) se pot înregistra pierderi de până la 77.78%.

2.2.6. Supraviețuirea celulelor probiotice în microsferile liofilizate

Supraviețuirea *B. lactis 300B* în microsferile de tip AP și AHPMC a avut tendința să scadă de-a lungul perioadei de depozitare. Viabilitatea probioticului în microsferile de alginat-pululan a fost menținută la 10^{10} UFC/g după 15 zile la temperatura camerei și respectiv 4°C . Pentru microsferile alginat-HPMC s-au înregistrat valori de 10^7 UFC/g după 15 zile la temperatura camerei și 10^9 UFC/g după 15 zile la 4°C (Fig. 9).

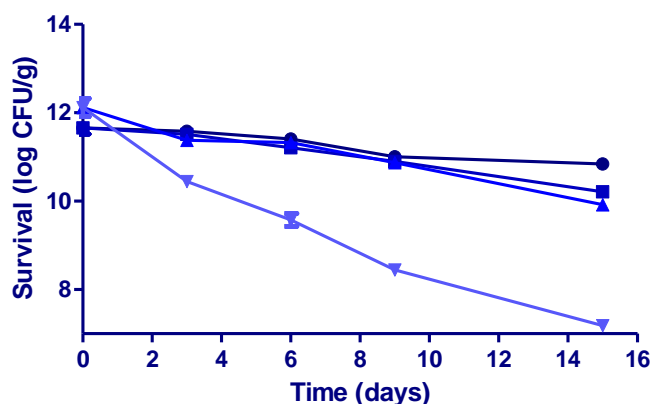


Fig. 9 Supraviețuirea probioticului în microsferile liofilizate după 3, 6, 9 și 15 zile de depozitare la temperatura camerei, respectiv la 4°C . Simboluri: (●) 4°C microsferile de alginat-pululan, (■) temperatura camerei microsferile de alginat-pululan, (▲) 4°C microsferile de alginat-HPMC, (▼) temperatura camerei microsferile de alginat-HPMC.

O temperatură apropiată de 0°C duce în general la o supraviețuire mai mare, în comparație cu temperaturi mai ridicate de depozitare (Heidebach et al., 2009; Picot and

Lacroix, 2004; Weinbreck et al., 2010), pentru că, temperaturile reduse presupun și o cantitate mai redusă de reacții metabolice (Tanghe et al., 2003). Această tendință este observată și în studiul de față la microsferile liofilizate. Rezultatele studiului demonstrează că după 15 zile de depozitare la temperatura camerei și respectiv la temperatura de refrigerare, *B. lactis 300B* își menține viabilitatea peste nivelul minim terapeutic recomandat ($>10^7$ UFC/g).

2.3. CONCLUZII

S-au utilizat șapte tipuri de polimeri și anume: hidroxipropil metilceluloză (HPMC), sodiu-carboximetil celuloză (Na-CMC), microcristalin celuloză (MCC), amidon BR-07, amidon BR-08, dextrină și pululan, cu scopul de a dezvolta formula optimă pentru încapsularea *Bifidobacterium lactis 300B* în microsferă de alginat. Rezultatele au arătat că cea mai bună protecție pentru celulele probiotice încapsulate a fost înregistrată la probele unde pululan-ul și respectiv HPMC au fost utilizați. Aceste două tipuri de microsferă au fost liofilizate, păstrate la temperatura camerei și la 4 °C timp de 15 zile, perioadă în care viabilitatea a fost testată. Rezultatele finale au arătat că microsferăle alginat-pululan au menținut viabilitatea probioticului peste nivelul minim recomandat ($>10^7$ UFC/g), chiar și după 15 zile. S-au discutat de asemenea și alți parametri precum eficiența încapsulării, rata de producție și sfericitatea.

CAPITOLUL 3

ÎNCAPSULAREA PROBIOTICULUI *BIFIDOBACTERIUM LACTIS 300B* ȘI TESTAREA VIABILITĂȚII ACESTUIA ÎNAINTE ȘI DUPĂ ÎNCAPSULARE, COATING ȘI LIOFILIZARE

Scopul acestui studiu a fost de a dezvolta un sistem inovativ de protecție a celulelor probiotice *Bifidobacterium lactis 300B* bazat pe încapsulare în matrice de alginat-pululan și învelirea microsferelor cu trei biopolimeri diferiți (aplicarea unui coating). În plus, au fost evaluate proprietățile fizico-chimice ale microsferelor obținute și liofilizate. S-a evaluat și capacitatea microsferelor rezultate de a proteja celulele probiotice în timpul expunerii la diferite temperaturi și intervale de timp.

Obiective

- Pregătirea formulei de încapsulare a celulelor probiotice *Bifidobacterium lactis 300B* în matrice de alginat-pululan (AP).
- Aplicarea a trei tipuri de coating-uri pe microsferele de alginat-pululan obținându-se astfel alte trei tipuri diferite de microsferă ce încorporează *Bifidobacterium lactis 300B*.
- Utilizarea metodei liofilizării pentru stabilizarea celulelor probiotice din microsferă astfel încât să se asigure doza terapeutică minimă după intervalul de timp propus și la diverse temperaturi.

Monitorizarea rezultatelor s-a realizat prin următoarele metode:

- Eficiența coating-ului s-a observat cu ajutorul unui microscop optic.
- Analiza comparativă a ratei de supraviețuire a celulelor probiotice după încapsulare și învelire (coating cu un strat exterior de chitosan).
- Analiza comparativă a viabilității celulelor probiotice încapsulate în microsferă cu și fără coating, în mediu gastrointestinal simulat.

3.1. MATERIALE ȘI METODE

3.1.1. Materiale

Alginate Manguel GMB a fost achiziționat de la FMC, Norvegia. Chitosanul și gelatina, clorura de calciu, pululanul, E-poli-L-lisina, glutaraldehida și fosfatul de sodiu au fost achiziționate de la Merk (Germania). S-au utilizat de asemenea, mediu agar selectiv (BSM) și peptonă achiziționate de la Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germania).

3.1.2. Tulpina probiotică

Tulpina probiotică utilizată în experiment a fost *Bifidobacterium lactis 300B*, sub formă liofilizată, achiziționată de la Howaru. Înainte de fiecare experiment s-a testat viabilitatea pudrei probiotice.

3.1.3. Pregătirea microsferelor de alginat-pululan

Microsferele au fost obținute aseptice prin folosirea unui Sferizator M, tip 2002SP-AE5-D0 la Brace GmbH Germania cu o dimensiune a duzei de 300 μm, și mixate în clorură de calciu (40 g/L). Înainte de încapsulare a fost utilizat vâscozimetrul Haake VT-2 pentru determinarea vâscozității amestecului obținut. Condițiile utilizate în procesul de încapsulare au fost: 15 g/L alginat, 75 g/L *B. lactis 300B* sub formă liofilizată, și 15 g/L pululan.

Eficiența încapsulării a fost determinată în conformitate cu metoda descrisă de Sandoval-Castilla și colab. (Sandoval-Castilla et al., 2010) cu mici modificări după cum urmează:

Eficiența încapsulării = $(a \times F / b) \times 100$ (UFC/g), unde "a" reprezintă UFC/g în microsfere, și "b" este UFC/g în mixul de alginat cu biopolimer, iar "F" este factorul de sfericitate $F=0.70$ (Aste and Weaire, 2008).

3.1.4. Dimensiunea microsferelor

Diametrul teoretic și cel corectat al microsferelor AP ce conțin *B. lactis 300B* a fost determinat folosind metoda descrisă de Chan și colab. (Chan et al., 2011b). Forma microsferelor a fost determinată cu ajutorul factorului de sfericitate (SF), dat de formula:

Factorul de sfericitate (SF) = $d_{\max} - d_{\min} / d_{\max} + d_{\min}$, unde d_{\max} reprezintă diametrul cel mai mare, iar d_{\min} reprezintă cel mai mic diametru determinat perpendicular pe d_{\max} .

3.1.5. Aplicarea coating-ului pe microsferile de alginat-pululan

Pe microsferile de alginat-pululan au fost aplicate trei tipuri de coating-uri, obținându-se astfel trei tipuri noi de microsferi.

1) Pentru primul coating s-a folosit o soluție 0.8 g/L E-poli-L-lisină și 1 g/L alginat (coating 1). Microsferile proaspăt obținute și spălate au fost imersate în soluția de E-poli-L-lisină sub agitare continuă, timp de 30 minute, după care microsferile au fost separate din soluție și limpezite cu soluție sterilă de NaCl. Următorul pas a constat în aplicarea coating-ului de alginat, prin imersarea microsferelor în soluția de alginat 1g/L timp de 30 minute sub continuă agitare. Ultimul pas a constat în limpezirea microsferelor.

2) Chitosan coating (coating 2): microsferile de alginat-pululan, proaspăt spălate au fost imersate în soluție 1g/L chitosan timp de 30 minute, după care au fost spălate cu soluție sterilă de NaCl.

3) Gelatina legată chimic (coating 3): microsferile de alginat-pululan au fost imersate în soluție de gelatină 100 g/L, timp de 60 minute la 32 °C în raport de 1:1.5 (m/m), sub agitare continuă. Următorul pas a constat în separarea microsferelor de soluția de gelatină și imersarea acestora, timp de 2 minute în soluție de glutaraldehidă (5 g/L), după care au fost spălate cu soluție NaCl (0,85 g/L) sterilă.

3.1.6. Procesul de liofilizare

Microsferile obținute au fost tratate termic la -18 °C după care au fost liofilizate utilizând liofilizatorul VaCo 5, Zirbus (Germania) cu următorii parametrii: -50 °C, 0.05 mbar timp de 24h. Probele au fost analizate imediat ce procesul de liofilizare a fost complet.

3.1.7. Viabilitatea celulară

Determinarea numărului de celule probiotice *B. lactis 300B* viabile a fost realizat înainte și după încapsulare, după aplicarea coating-urilor și respectiv după procesul de liofilizare. Eliberarea celulelor încapsulate s-a realizat prin imersarea acestora în soluție de fosfat buffer cu pH 7.4±0.2. În continuare s-au realizat diluții succesive în apă peptonată (peptonă 1g/L, clorură de sodiu 5g/L și Tween 80 ml/L). O cantitate de 1 ml din ultimele trei diluții a fost folosită pentru determinarea celulelor probiotice viabile prin cultivarea lor pe mediu agar nutritiv. Incubarea plăcilor Petri inoculate s-a realizat la 37 °C timp de 72 h, după

care s-au numărat unitățile formatoare de colonii. Rezultatele au fost exprimate în \log_{10} UFC. Toate deretminările s-au efectuat în triplicat.

3.5.8. Evaluarea eliberării celulelor probiotice *B. lactis 300B* în mediu intestinal simulat

Mediul intestinal a fost simulat de buffer-ul fosfat care a fost utilizat pentru eliberarea celulelor probiotice din interiorul microsferelor. Primul experiment s-a realizat în fosfat buffer cu un pH de 5.5 ± 0.2 fără a se observa dezintegrarea microsferelor. Pentru simularea mediului intestinal s-a modificat pH-ul buffer-ului până la 7.4 ± 0.2 , cu ajutorul unei soluții sterile de hidroxid de sodiu.

3.1.9. Analiza statistică

Analiza statistică a fost realizată cu ajutorul programului statistic Graph Prism Version 4.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Dimensiunile microsferelor au fost calculate cu ajutorul programului Microsoft Excel 2010.

3.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.2.1. Caracterizarea procesului de încapsulare

Producția de microsferă s-a realizat la scară de laborator, obținându-se o producție medie de 11.56 g/min microsferă alginat-pululan. Caracteristicile microsferelor obținute au fost influențate de vâscozitatea mixului folosit și de parametrii procesului de încapsulare (Chan et al., 2009).

3.2.2. Caracterizarea microsferelor. Eficiența încapsulării

Forma și dimensiunea microsferelor obținute s-a determinat cu ajutorul unui microscop optic.

În Tabel 6 sunt prezentate dimensiunile celor patru tipuri de microsferă, respectiv randamentul de încapsulare în microsferăle de alginat-pululan. Diametrul mediu al microsferelor peste care s-a aplicat coating-ul a fost semnificativ ($p < 0.05$) mai mare în comparație cu microsferăle fără coating. După cum se poate observa în Fig. 10 coating-ul influențează atât forma cât și dimensiunea microsferelor.

Tabel 6

Dimensiunea și randamentul de încapsulare pentru microsferile cu și fără coating

Tipul de microsfere	Dimensiunea microsferelor (μm)	Randament încapsulare (%)
	(n=10)	(n=10)
Alginat-Pululan	1110.5 \pm 12.7 ^a	66.87 \pm 0.28
După Coating 1 (polilisină-alginat)	1269.5 \pm 14.4 ^{bd}	Nd
După Coating 2 (chitosan)	1245 \pm 9.2 ^c	Nd
După Coating 3 (gelatină)	1275 \pm 5.9 ^d	Nd

Note: Valorile notate cu litere diferite pe coloană prezintă diferențe semnificative ($p < 0.05$).

nd –nedeterminat

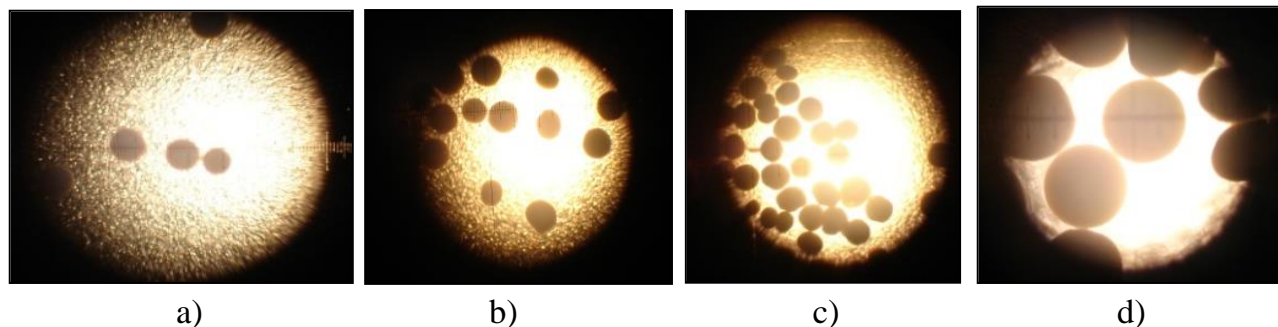


Fig. 10 Imagine la microscop a celor patru tipuri de microsfere conținând *B. lactis* a) alginat-pululan; b) microsfere de alginat-pululan ce au un coating de alginat; c) microsfere de alginat-pululan ce au un coating de chitosan; d) microsfere de alginat-pululan ce au un coating de gelatină

Încapsularea probioticului *B. lactis* în microsferile de alginat poate fi influențată de dimensiunea microsferelor, timpul de gelifiere în clorura de calciu, concentrația de celule viabile și a matricei de alginat (Chavarri et al., 2010). În literatură (Chavarri et al., 2010 Mokarram et al., 2009)), este raportat faptul că randamentul de încapsulare (66,87 \pm 0,28) în microsferile de alginat-pululan este semnificativ mai mare față de cel obținut în cazul microsferelor de tip alginat-chitosan.

3.2.3. Viabilitatea celulelor probiotice *B. lactis* 300B

Este cunoscut faptul că, factori precum pH-ul, natura mediului de eliberare, prezența nutrienților și condițiile de incubare influențează viabilitate probioticului încapsulat (Özera et al., 2009). Viabilitatea probioticului *B. lactis* 300B încapsulat în microsferile de tip alginat-

pululan, respectiv în microsferile alginat-pululan cu diverse coating-uri este reprezentată în Fig. 11. Pudra liofilizată de celule probiotice *Bifidobacterium* va conține atât celule viabile nedeteriorate cât și celule deteriorate. În condiții adecvate celulele vătămate se pot repara, astfel încât să devină viabile, ex. capabile să formeze colonii pe un mediu adecvat (Cui et al., 2000). Eliberarea celulelor din microsferile de alginat-pululan cu coating de gelatină nu a fost posibilă. Se poate observa faptul că în urma procesului de încapsulare și respectiv al celui de aplicare a coating-ului, viabilitatea celulelor nu a fost afectată semnificativ. Celulele probiotice din microsferile de alginat-pululan au demonstrat cea mai mare rată de viabilitate 11^5 UFC/g, valoare similară observându-se în cazul microsferelor de alginat-pululan la care s-a aplicat un coating de alginat.

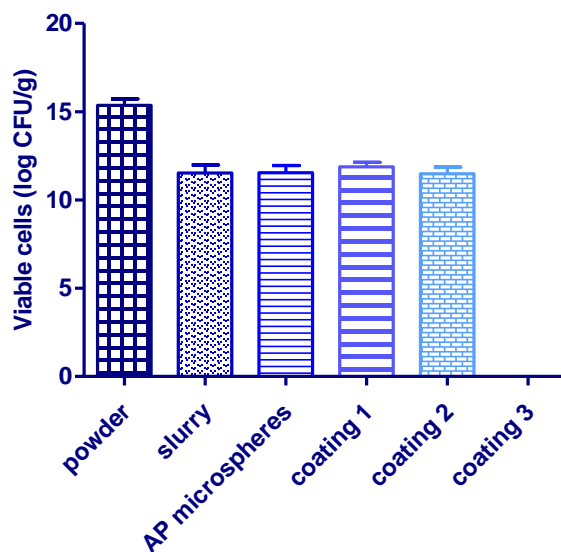


Fig. 11 Compararea viabilității celulelor probiotice după procesul de încapsulare și respectiv cel de aplicare a coating-ului (microsfere – alginat-pululan; coating 1 – microsfere de alginat-pululan cu coating de alginat; coating 2 - microsfere de alginat-pululan cu coating de chitosan; coating 3 - microsfere de alginat-pululan cu coating de gelatină).

3.2.4. Efectul liofilizării pe timp îndelungat asupra viabilității celulelor probiotice

Stabilitatea viabilității celulelor probiotice *B. lactis 300B* în microsferile liofilizate pe parcursul a 3, 6, 9 și 15 zile la temperatura camerei și la 4 °C poate fi observată în Fig. 12.

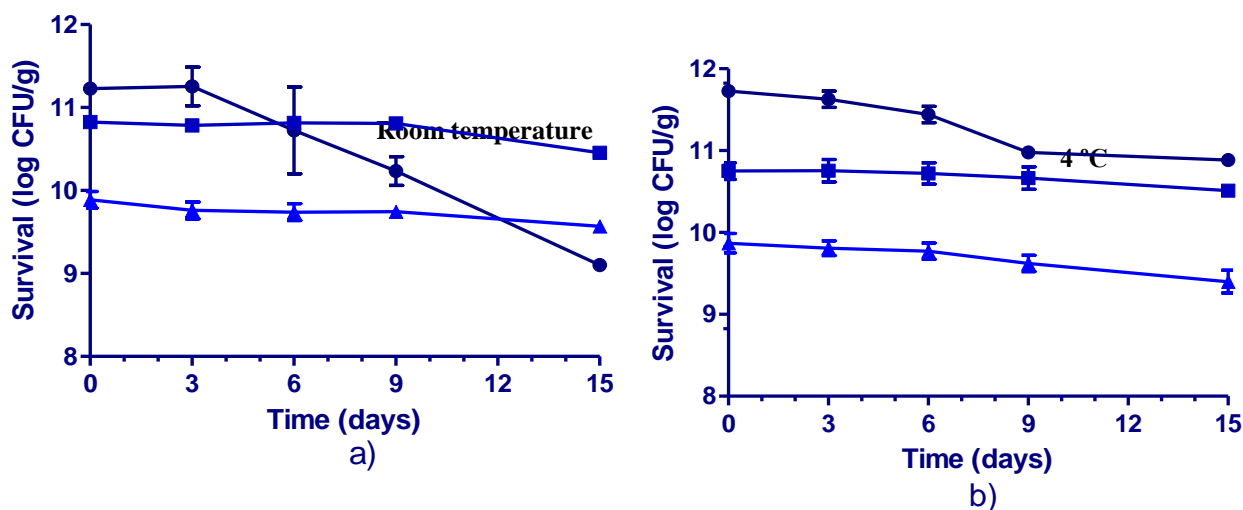


Fig. 12 Stabilitatea viabilității celulelor probiotice în microsferile liofilizate pe parcursul a 3, 6, 9 și 15 zile la a) temperatura camerei și la b) 4 °C (●) microsferă de alginat-pululan, (■) microsferă de alginat-pululan coated cu alginat, (▲) microsferă de alginat-pululan coated cu chitosan.

Viabilitatea a fost menținută până la valoarea de 10^9 UFC/g după aproximativ patru săptămâni de depozitare la temperatura camerei. Probele depozitate la temperatura de refrigerare au înregistrat valori medii mai ridicate ale viabilității probioticului încapsulat, trend remarcat și de alte studii din literatură (Cui et al., 2000; Saarela et al., 2011).

3.2.5. Eliberarea celulelor probiotice *B. lactis 300B* în mediul intestinal simulat

După 20 minute expunere la continuă agitare în mediu fosfat buffer (pH 7,4) toate probele s-au dezintegrat și eliberarea celulelor încapsulate a avut loc, exceptând proba unde coating-ul s-a realizat cu gelatină. Microsferăle de alginat-pululan care au avut gelatina ca și coating nu s-au dezintegrat nici în mediul acid, nici în mediul bazic, după 24 h

3.3 CONCLUZII

- Încapsularea probioticului *B. lactis 300B* s-a realizat în matrice de alginat-pululan, obținându-se rezultate optime în ceea ce privește randamentul de încapsulare, proprietățile microsferelor obținute și viabilitatea celulelor probiotice.

- Alginatul, chitosanul și gelatina sunt materiale corespunzătoare în vederea învelirii microsferelor de alginat-pululan cu un strat protector (coating).
- Studiul de față a demonstrat faptul că supraviețuirea celulelor probiotice încapsulate în matrice de alginat-pululan se menține mai ridicată decât nivelul minim recomandat (10^7 UFC/g), atât înainte cât și după liofilizare.
- Metoda folosită pentru liofilizarea microsferelor s-a demonstrat a fi optimă pentru a menține viabilitatea celulară în timp și la diverse temperaturi, atât în cazul microsferelor fără coating, cât și în cazul celor cu coating.
- Probele de microsferă care au avut aplicat un strat protector (coating) au demonstrat o protecție mai bună pentru celulele probiotice încapsulate, pe o perioadă de 15 zile de depozitare la temperatura camerei și/sau la 4 °C, dar nu statistic semnificativ diferit față de probele care au fost încapsulate în microsferă de alginat-pululan fără coating.

CAPITOLUL 4

COMPARAREA STABILITĂȚII PROBIOTICULUI *LACTOBACILUS CASEI* LIBER ȘI ÎNCAPSULAT DEPOZITAT ÎN IAURT

INTRODUCERE

Scopul acestui studiu a constat în investigarea efectului încapsulării asupra probioticului *L. casei*, în iaurt, prin compararea depozitării pe o perioadă de 35 zile, a viabilității celulelor neîncapsulate cu a celor încapsulate, și determinarea valorii pH-ului iaurtului pe perioada de depozitare.

Obiective

- Încapsularea probioticului *L. casei* în matrice de alginat și alginat-pectină, și liofilizarea microsferelor.
- Încorporarea microsferelor liofilizate în iaurt.
- Testarea viabilității celulelor probiotice pe o perioadă de 35 de zile.
- Determinarea dinamicii acidifierii iaurtului ce conține celule probiotice neîncapsulate, respectiv iaurt cu celule probiotice încapsulate.

Pentru realizarea obiectivelor propuse, s-au utilizat următoarele **metode**:

- Pentru încapsularea probioticului *L. casei* în matrice de alginat și alginat-pectină s-a utilizat gelifierea prin crosslinking.
- Viabilitatea celulelor probiotice încapsulate în matrice de alginat și matrice de alginat-pectină, depozitate în iaurt, după 5, 10, 25, 20, 25, 30 și 35 zile.

4.1. MATERIALE ȘI METODE

4.1.1. Pregătirea microorganismelor, mediul și condițiile de creștere

Probioticul utilizat, *Lactobacillus casei*, a fost achiziționat de la Bioaqua, Romania, și cultivat în 5 ml, respectiv 95 ml bulion nutritiv MRS (Merck, Germany) timp de 24 h la 37 °C. S-a utilizat centrifugarea (3000 rpm, 5 min la 25°C) pentru separarea celulelor probiotice. Toate materialele și soluțiile utilizate au fost autoclavate la 121 °C timp de 15 min.

4.1.2. Microîncapsularea probioticului *L. casei*

Încapsularea probioticului *L. casei* s-a realizat în două tipuri de matrici: alginat și alginat-pectină. Condițiile experimentale au fost: a) 1.5% alginat; b) 1.5% alginat + 1,5% pectină, la care s-a adăugat celule probiotice *L. casei* aproximativ 10^{10} UFC/ml. Pentru obținerea microsferelor s-a utilizat încapsulatorul Multinozzle Biotech Encapsulator (EncapBioSystems Inc.), la care s-a atașat duza de 300 μm. S-a utilizat baia de întărire de clorură de calciu (Sigma Aldrich, Germany), (40 g/L).

4.1.3. Examinarea microsferelor din alginat și a celor din alginat-pectină

Dimensiunea, aria, perimetrul și diametrul microsferelor obținute au fost determinate cu ajutorul microscopului Axio Observer Zeiss.

4.1.4. Liofilizarea microsferelor ce conțin *L. casei*

Condițiile procesului de liofilizare au fost: -50 °C, 0.05 mbar timp de 24h, utilizându-se un liofiloizator CHRIST alpha 1-2/LD plus. Materialul liofilizat a fost colectat în recipiente sterile și introdus în iaurtul în curs de formare.

4.1.5. Obținerea iaurtului cu microsfere ce conțin *L. casei*

Lapte cu 3,5% grăsime a fost inoculat cu culturi starter pentru iaurt și omogenizat corespunzător, incubat la 37 °C timp de 6 h. După acest interval de timp s-au adăugat microsferele de alginat și respectiv alginat-pectină. După omogenizare, amestecul a fost incubat în aceleași condiții pentru încă 18 h. Procul descris este reprezentat schematic în Fig. 13

Error! Reference source not found..

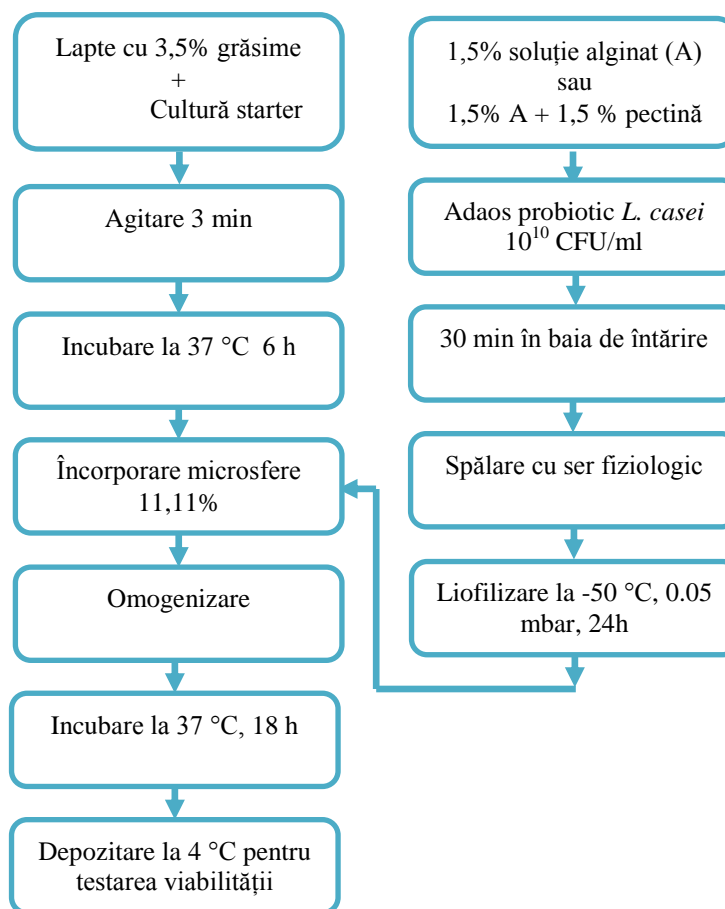


Fig. 13 Schema procesului de obțiere a iaurtului ce încorporează microsferă cu *Lactobacillus casei*.

4.1.6. Dinamica acidifierii iaurtului ce conține *L. casei*, încapsulat și neîncapsulat

Dinamica acidifierii iaurtului s-a determinat prin monitorizarea pH-ului în probele de iaurt ce conțin *L. casei* liber și respective încapsulat. Determinarea s-a realizat pe o perioadă de incubare de 45h la 37 °C.

4.1.7. Determinarea numărului de celule viabile

Separarea microsferelor de iaurt s-a realizat prin spălare cu ser fiziologic pe o sită sterilă. Eliberarea celulelor încapsulate s-a realizat prin imersarea acestora în fosfat buffer, după care s-a aplicat tehnica diluțiilor și cultivarea pe plăci Petri. Toate determinările s-au realizat în triplicat la un interval de 5 zile.

4.1.8. Analiza statistică

Analiza statistică a fost realizată cu ajutorul programului statistic Graph Prism Version 4.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Dimensiunile microsferelor au fost calculate cu ajutorul programului Microsoft Excel 2010.

4.2. RESULTATE ȘI DISCUȚII

4.2.1. Caracterizarea microsferelor obținute

Dimensiunea și forma microsferelor obținute a fost determinată cu ajutorul unui microscop optic. Dimensiunea acestora a variat între 1.3 și 1.7 mm, prezentând o formă sferică. Aria microsferelor a variat între 4 și 4.3 mm², iar perimetrul între 8 și 8.3 mm.

4.2.2. Iaurt cu conținut de probiotice încapsulate

Inocularea iaurtului cu celule probiotice libere și respectiv încapsulate a constat în: celulele probiotice libere și respectiv microsferele ce conțin celulele probiotice au fost adăugate în laptele ce conține culturi pentru iaurt după 6h de incubare la 37 °C, după care s-a continuat incubarea până la obținerea coagulului de iaurt.

4.2.3. Dinamica acidifierii iaurtului

Dinamica acidifierii iaurtului a fost urmărită timp de 48 h, după inocularea cu celule probiotice libere și respectiv încapsulate. Inițial, celulele probiotice au reprezentat aproximativ 10¹⁰ UFC/ml. S-a putut observa o acidifiere mai atenuată la probele de iaurt unde s-au utilizat microsfere cu celule probiotice (Fig. 14). Probele la care s-au utilizat celule probiotice neîncapsulate au înregistrat un pH de 5.2 după 6h, în timp ce probele cu microsferele ce conțin *L. casei* au ajuns la același pH după aproximativ 25h. Modele asemănătoare sunt relatate în literatură (Sultana et al., 2000), unde se arată că utilizarea unei matrici de alginat-amidon a întârziat cu aproximativ 20% timpul de atingere a unui pH de 5, în comparație cu proba unde probioticul neîncapsulat a fost utilizat. Acest fapt ne determină să concluzionăm că matricea folosită împiedică eliberarea metaboliților. Nu s-a înregistrat o diferență semnificativă între probele de iaurt cu microsfere de alginat și cele cu microsfere de alginat-pectină.

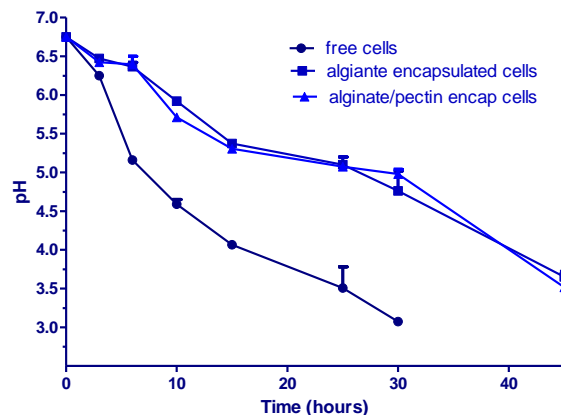


Fig. 14 Cinetica pH-ului în iaurturi ce conțin *L. casei* liber și respectiv încapsulat.

4.2.4. Viabilitatea probioticului *L. casei* încapsulat, introdus în iaurt pe o perioadă de 35 zile

Monitorizarea viabilității celulelor probiotice a fost făcută pe o perioadă de 35 de zile, testele fiind efectuate la fiecare 5 zile, în timpul depozitării la temperatura de 4 °C. Studiul de supraviețuire a celulelor probiotice viabile în microsferă de alginat și alginat-pectină demonstrează un tipar. A existat o scădere de aproximativ 1 log₁₀ după 35 zile, comparativ cu numărul inițial de celule probiotice prezente în prima zi, în ambele forme încapsulate.

În Fig. 15 este prezentată rata de supraviețuire (log₁₀ UFC/g) a probioticului *L. casei* în microsferă de alginat, stocate în iaurt timp de 35 de zile.

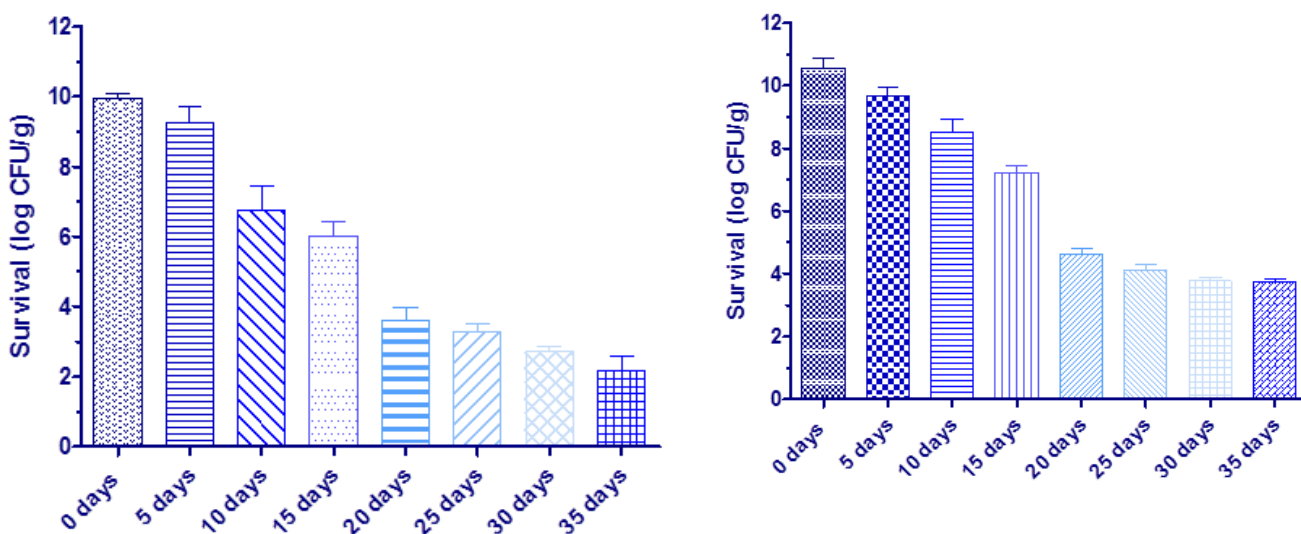


Fig. 15 Supraviețuirea *L. casei* încapsulat în matrice de alginat în iaurt 35 zile.

Fig. 16 Supraviețuirea *L. casei* încapsulat în matrice de alginat-pectină în iaurt 35 zile.

În Fig. 16 este prezentată scăderea viabilității în microsferelor de alginat-pectină. Se poate observa că scăderea viabilității celulelor probiotice din microsferelor de alginat-pectină nu a fost mai mult de $2 \log_{10}$ în primele 15 zile. Cu toate acestea, peste alte 20 de zile, scăderea este mai semnificativă, celulele *L. casei* fiind găsite într-un număr de numai 10^4 UFC/g în probele de iaurt.

4.3. CONCLUZII

Concluziile capitolului sunt:

- Încapsularea *L. casei* s-a dovedit a da cele mai bune rezultate atunci când a fost utilizat un amestec de alginat-pectină, în loc de alginat.
- Dimensiunea microsferelor obținute variază între 1,3 și 1,7 mm.
- Aciditatea iaurtului cu *L. casei* adăugat s-a dovedit a fi mai mare pentru celulele libere, în timp ce pH-ul iaurtului cu celule probiotice încapsulate nu a prezentat valori sub 5, chiar și după 30 de zile de depozitare.
- Rata de supraviețuire a *L. casei* a fost aproape sub 10^4 UFC/g în probele în care a fost utilizată matricea de alginat pentru încapsulare, după 20 de zile de stocare la $4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$; în timp ce probele în care a fost utilizată matricea de alginat-pectină, după aceeași perioadă de timp, viabilitatea a fost aproape de 10^5 UFC/g.
- În ceea ce privește viabilitatea *L. casei* încapsulat în microsferelor liofilizate, s-a dovedit a fi mai mare decât nivelul minim terapeutic, după 15 zile la $4 \text{ }^\circ\text{C}$ în iaurt.
- Accesibilitatea celulelor probiotice încapsulate, pentru consumator, poate fi facilitată prin adăugarea microsferelor în produsele lactate uzuale, precum iaurt.

CONCLUZII GENERALE

Având în vedere obiectivele principale ale cercetării și rezultatele obținute prin diferite investigații experimentale, putem sublinia principalele realizări:

- Încapsularea probioticului *Lactobacillus plantarum* în matrice de alginat cu coating de chitosan, și suc verde de lucernă ca prebiotic.
- Evaluarea acestor microsfele în suc gastrointestinal simulat (trecere pe suc gastric urmată de trecere pe suc intestinal).
- Influența diferitelor matrici de încapsulare asupra proprietăților fizice ale microsferelor și asupra supraviețuirii celulelor probiotice *Bifidobacterium lactis* încapsulate în acest tip de microsfele.
- Evaluarea dinamicii stabilității celulelor probiotice *Lactobacillus casei* libere și respectiv încapsulate, inoculate în iaurt pe o perioadă de 45 de zile.

În conformitate cu informațiile recente din literatură, acesta este primul studiu în ceea ce privește testarea comportamentului celulelor probiotice precum *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* și *Bifidobacterium lactis 300B* în matrici unde alginatul a fost utilizat în combinație cu hidroxipropil metilceluloza (HPMC), sodiu-carboximetil celuloza (Na-CMC), microcristalin celuloza (MCC), amidon BR-07, amidon BR-08, dextrina și pululan. De asemenea efectul diferitelor matrici folosite asupra proprietăților microsferelor și efectul acestor proprietăți asupra viabilității celulelor probiotice încapsulate este o raportare inovativă, deci poate fi înregistrată ca o activitate biologică nouă. Experimentele prezentate în teza de față sunt contribuții originale care aduc un plus de valoare rezultatelor deja existente pe această temă – bioîncapsularea probioticelor. S-a demonstrat faptul că prin încapsularea probioticelor precum *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* și *Bifidobacterium lactis 300B* se pot garanta beneficiile rezultate în urma consumului de probiotice.

Perspective de viitor:

Ca planuri de viitor, ar putea fi utilă găsirea de noi combinații de polimeri, care sunt potrivite pentru bioîncapsularea celulelor probiotice specifice, în scopul de a obține

proprietăți excelente care să promoveze potențialul benefic al probioticelor și proprietățile microsferelor (ex. randamentul încapsulării, eficiența încapsulării, proprietăți micrometrice ale microsferelor adecvate, eliberarea țintită și controlată).

Aplicarea tehnicii de încapsulare în scopul de a obține microsferă cu nanoparticule încapsulate, pentru o eliberare țintită și controlată este de asemenea un obiectiv propus.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Albertini, B., Vitali, B., Passerini, N., Cruciani, F., Di Sabatino, M., Rodriguez, L., & Brigidi, P. (2010). Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40(4), 359-366.
2. Anal, A.K., Bhopatkar, D., Tokura, S., Tamura, H., & Stevens, W.F. (2003). Chitosan-alginat multilayer beads for gastric passage and controlled intestinal release of protein. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29(6), 713-724.
3. Anal, A.K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240-251.
4. Anal, A.K., & Stevens, W.F. (2005). Chitosan-alginat multilayer beads for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics*, 290(1-2), 45-54.
5. Annan, N.T., Borza, A.D., & Hansen, L.T. (2008). Encapsulation in alginat-coated gelatin microsferes improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, 41(2), 184-193.
6. Augustin, M.A., & Sanguansri, L., (2003). Encapsulation of food ingredients.
7. Augustin, M.A., Sanguansri, L., Margetts, C., & Young, B. (2001). Microencapsulation of food ingredients In *Proceedings of the Conference Name* |, Conference Location|.
8. Brachkova, M.I., Duarte, M.A., & Pinto, J.F. (2010). Preservation of viability and antibacterial activity of *Lactobacillus spp.* in calcium alginat beads. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(5), 589-596.
9. Brandau, T. (2002). Preparation of monodisperse controlled release microsferes. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 179–184.

10. Brinques, G.B., & Ayub, M.A.Z. (2011). Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*, 103(2), 123-128.
11. Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467-483.
12. Capela, P., Hay, T.K.C., & Shah, N.P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39, 203–211.
13. Capela, P., Hay, T.K.C., & Shah, N.P. (2007). Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. *Food Research International*, 40(10), 1261-1269.
14. Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., & Gibbs, P. (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14, 835–847.
15. Chan, E.-S., Lee, B.-B., Ravindra, P., & Poncelet, D. (2009). Prediction models for shape and size of calcium-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338(1), 63-72.
16. Chan, E.-S., Lim, T.-K., Voo, W.-P., Pogaku, R., Tey, B.T., & Zhang, Z. (2011a). Effect of formulation of alginate beads on their mechanical behavior and stiffness. *Particuology*, 9(3), 228-234.
17. Chan, E.-S., Wong, S.-L., Lee, P.-P., Lee, J.-S., Ti, T.B., Zhang, Z., Poncelet, D., Ravindra, P., Phan, S.-H., & Yim, Z.-H. (2011b). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymers*, 83(1), 225-232.
18. Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 27-35.

19. Chang, T.M.S. (1971). Stabilisation of enzymes by microencapsulation with a concentrated protein solution or by microencapsulation followed by cross-linking with glutaraldehyde. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 44(6), 1531-1536.
20. Chavarri, M., Maranon, I., Ares, R., Ibanez, F.C., Marzo, F., & Villaran, M.d.C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginat-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), 185-189.
21. Cui, J.-H., Goh, J.-S., Kim, P.-H., Choi, S.-H., & Lee, B.-J. (2000). Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginat poly-l-lysine microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 210(1-2), 51-59.
22. Donati, I., Holtan, S., Morch, Y.A., Borgogna, M., Dentini, M., & Skjak-Braek, G. (2005). New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginat gels. *Biomolecules*, 6(2), 1031-1040.
23. Goh, C.H., Heng, P.W.S., & Chan, L.W. (2012). Alginats as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 1-12.
24. Grabnar, P.A., & Kristl, J. (2011). The manufacturing techniques of drug-loaded polymeric nanoparticles from preformed polymers. *Journal of Microencapsulation*, 28(4), 323-335.
25. Heidebach, T., Forst, P., & Kulozik, U. (2009). Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1670-1677.
26. Kennedy, J.F., & Panesar, P.S. (2006). C. Onwulata (Ed.), Encapsulated and Powdered Foods, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2005 *Carbohydrate Polymers*, 63(4), 569.
27. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginat beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14(8), 737-743.

28. Leathers, T.D. (2003). Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 468–473.
29. Mokarram, R.R., Mortazavi, S.A., Najafi, M.B.H., & Shahidi, F. (2009). The influence of multi stage alginat coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International*, 42(8), 1040-1045.
30. Murata, Y., Toniwa, S., Miyamoto, E., & Kawashima, S. (1999). Preparation of alginat gel beads containing chitosan nicotinic acid salt and the functions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 48(1), 49-52.
31. Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1(0), 1806-1815.
32. Nienaltowska, K., Perfetti, G., Meesters, G.M.H., Ronsse, F., Pieters, J.G., Dewettinck, K., & Depypere, F. (2010). Attrition strength of water-soluble cellulose derivatives coatings. *Powder Technology*, 198(2), 298-309.
33. Nochos, A., Douroumis, D., & Bouropoulos, N. (2008). In vitro release of bovine serum albumin from alginat/HPMC hydrogel beads. *Carbohydrate Polymers*, 74(3), 451-457.
34. Picot, A., & Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microsferes and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, 14(6), 505-515.
35. Poncelet, D., Blitz, J., & Gun'ko, V., (2006). Microencapsulation: fundamentals, methods and applications
36. Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science. Springer Netherlands.
37. Rassis, D.K., Saguy, I.S., & Nussinovitch, A. (2002). Collapse, shrinkage and structural changes in dried alginat gels containing fillers. *Food Hydrocolloids*, 16(2), 139-151.
38. Rodriguez-Huezo, M.E., Duran-Lugo, R., Prado-Barragan, L.A., Cruz-Sosa, F., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E.J. (2007). Pre-selection of

protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. *Food Research International*, 40(10), 1299-1306.

39. Saarela, M., Alakomi, H.L., Motto, J., Ahonen, A.M., Puhakka, A., & Tynkkynen, S. (2011). Improving the storage stability of *Bifidobacterium breve* in low pH fruit juice. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 106-110.

40. Shahidi, F., & Han, X.Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 501-547.

41. Simpson, P.J., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., & Ross, R.P. (2005). Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 493-501.

42. Singh, R.S., Saini, G.K., & Kennedy, J.F. (2008). Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73(4), 515-531.

43. Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginat-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1-2), 47-55.

44. Tanghe, A., Van Dijck, P., & Thevelein, J.M., (2003). Determinants of Freeze Tolerance in Microorganisms, Physiological Importance, and Biotechnological Applications, *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press.

45. Thalberg, K., Lindholm, D., & Axelsson, A. (2004). Comparison of different capacitaea de curgere tests for powders for inhalation. *Powder Technology*, 146(3), 206-213.

46. Vandamme, T., Poncelet, D., & Subra-Paternault, (2007). *Microencapsulation*, Lavoisier.

47. Vodnar, D.C., Venus, J., Schneider, R., & Socaciu, C. (2010). Lactic Acid Production by *Lactobacillus paracasei* 168 in Discontinuous Fermentation Using Lucerne Green Juice as Nutrient Substitute. *Chemical Engineering & Technology*, 33(3), 468-474.

48. Weinbreck, F., Bodnar, I., & Marco, M.L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 364-367.

49. Zohar-Perez, C., Chet, I., & Nussinovitch, A. (2004). Irregular textural features of dried alginat-filler beads. *Food Hydrocolloids*, 18(2), 249-258.