



ENKAPSULACE PROBIOTIK

Jiří Žeravík, Jakub Florian, Iveta Hynštová,
Robert Kadlec

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Encapsulation of probiotics

Abstrakt

Přirozená mikrobiota gastrointestinálního traktu (GIT) hraje velmi důležitou roli v lidském zdraví. Změny chování a návyků společnosti za poslední století, ať už stravovacích, tak i hygienických, však měly dopad na její rozmanitost a poměr zastoupení jednotlivých druhů mikroorganismů. Jednou ze strategií, jak obnovit mikrobiální homeostázi ve střevě, je použití probiotik. Probiotika jsou živé mikroorganismy, které napomáhají správné funkci tlustého střeva. Při pasáži horními částmi gastrointestinálního traktu však může docházet k výraznému snížení jejich počtu. Proto jsou studovány různé metody enkapsulace, které mohou zvýšit míru přežití probiotik v průběhu pasáže GIT, ale i během přípravy a skladování probiotických přípravků.

Klíčová slova: extruze, sprejové sušení, sprejové chlazení, emulgace, koacervace.

Abstract

Natural microbiota of the gastrointestinal tract (GIT) plays important role in human health. Changes in behavior and habits in food and hygiene in society over the past century have had an impact on the diversity of the intestinal microbiota. One strategy to restore the microbial homeostasis in the intestine is the use of probiotics. Probiotics are live microorganisms that aid proper function of the colon. The passage of probiotics through the upper parts of the gastrointestinal tract may cause significant reduction in their number. Encapsulation is one of the methods which may increase the survival rate of probiotics during passage of the GIT but also during preparation and storage of probiotic products.

Key words: extrusion, spray drying, spray cooling, emulsification, coacervation.

Úvod

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou probiotika definována jako živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v dostatečném množství (10^8 až 10^9 KTJ g^{-1}), podporují zdraví hostitele. Komerčně dostupné probiotické přípravky obsahují probiotika v rozmezí 10^6 až 10^{12} KTJ g^{-1} . Optimální počet KTJ je pro každý kmen individuální, odvozuje se od dávek použitých při studiích na zvířatech (Haffner a kol., 2016).

V posledních letech je patrný růst užívání probiotik v potravinách s cílem zvýšit nutriční a terapeutickou hodnotu potravinových produktů. V rámci této snahy byly studovány různé probiotické kmeny, některé z nich poté byly také komerčně využívány. Nicméně, udržování životaschopnosti mikroorganismů po celou dobu životnosti produktu je velkou výzvou pro potravinářský průmysl, jelikož některé kultury jsou extrémně citlivé na faktory okolního prostředí, jako kyselost prostředí, obsah emulgujících látek a obsah kyslíku. Nízká hodnota pH v žaludku spolu s přítomností žlučových solí v tenkém střevě jsou hlavními důvody pro dramatický pokles životaschopnosti probiotik při jejich tranzitu do tlustého střeva. Z tohoto důvodu je široce studována možnost ochrany probiotik pomocí enkapsulace (Etchepare a kol., 2016).

Enkapsulace - obalení nebo zalití živých probiotik do biopolymerních matic, je jedním z účinných způsobů ochrany probiotik před stresem během zpracování, skladování a gastrointestinálního tranzitu. Tím se zvyšuje přežívání buňky, jakož i ochrana buňky před kyselým prostředím žaludku, žlučovými solemi, trávicími enzymy, přičemž následuje uvolnění buněk z kapsle v oblasti tlustého střeva (Haffner a kol., 2016). Životaschopnost enkapsulovaných buněk lze mimo jiné zvýšit přidáním prebiotik (Valero-Cases a Frutos, 2015; Haffner a kol., 2016) nebo v rámci kapsle vytvořit kolonie bakterií obalené extracelulárními polymerními látkami, které jsou součástí biofilmu (Haffner a kol., 2016). Bylo zjištěno, že biofilm tvořící bakterie vykazují větší odolnost v porovnání s planktonickou formou proti působení antibakteriálních látek a různých stresů vyskytujících se v okolí dané kapsle (Salas-Jara a kol., 2016). Probiotika obalená

extracelulární matrix představují lepší kandidáty na enkapsulaci, protože jsou více odolné vůči zátěži, ke které dochází během zpracování a tranzitu v GIT (Haffner a kol., 2016).

Materiály pro enkapsulaci probiotik

Pro enkapsulaci probiotik je dostupná řada biodegradabilních biopolymerních materiálů, které se používají v závislosti na požadovaných fyzikálně-chemických vlastnostech transportního mechanismu. Tyto biopolymerní materiály lze rozdělit do několika skupin, jako jsou polysacharidy, proteiny a lipidy. Pro řadu aplikací je výhodou enkapsulovat probiotika do hydrogelových částic, které dokážou zachytit bakterii spolu s malými částicemi biopolymeru. Tyto mikrogely jsou navrhovány tak, aby enkapsulovaly vysoké koncentrace probiotik a zároveň je ochránily od environmentálních stresů (Haffner a kol., 2016).

Mezi nejčastěji používané přírodní polysacharidy patří algináty, karagenany, agar/agaróza, gellanová guma, arabská guma, xanthanová guma, škrob, modifikované škrobové materiály, celulóza, pektin, inulin, chitosan a jeho deriváty (Etchepare a kol., 2016; Ying a kol., 2016; Chen a kol., 2015; Martin a kol., 2015; Valero-Cases a Frutos, 2015; Varankovich a kol., 2015; Bosnea a kol., 2014). Z proteinů se nejčastěji využívá polypeptid polylysin a proteiny jako jsou želatina, syrovátka, rostlinné proteiny, mléčné proteiny (Huang a kol., 2017; Ying a kol., 2016; Martin a kol., 2015; Varankovich a kol., 2015; Bosnea a kol., 2014). V rámci lipidů se nejčastěji využívají vosky, fosfolipidy a oleje (Ying a kol., 2016; Martin a kol., 2015; Haffner a kol., 2016; Etchepare a kol., 2016). Vedle toho je také snahou využít komplexní matrice (Ying a kol., 2016) popřípadě přirozené materiály, jako je například mléko v kombinaci s alginátem (Shi a kol., 2013).

Z výše uvedených materiálů se vytváří struktura kapsle, která nejenom odolává vnějším vlivům v GIT, ale zároveň napomáhá k uvolnění probiotik z kapsle v oblasti působení. V rámci konstrukce se můžeme setkat s několikavrstvými částicemi, které odolávají výše uvedeným vlivům. Ideální kapsle by měla dopravit probiotikum na určené místo působení a napomoci s osídlením okolní oblasti tímto probiotikem. Vedle transportní odolnosti tyto enkapsulační materiály jsou kombinovány s materiály, které napomáhají přežití probiotik během výrobního procesu a skladování (Haffner a kol., 2016).

Metody enkapsulace

Tvorba kapslí a jejich finální podoba závisí na technologickém postupu výroby a také na materiálech, ze kterých se kapsle tvoří. Z hlediska technologických procesů se jedná o sprejové sušení, sprejové chlazení, sprejové potahování, lyofilizace, emulgace, tvorba liposomů, koacervace a extruze (Haffner a kol., 2016).

Sprejové sušení

Technologie sprejového sušení je nejrozšířenější enkapsulační technika v potravinářském průmyslu, a to díky proveditelnosti kontinuální produkce a možnosti připravit na míru technologii v závislosti na plnivu a enkapsulačních látkách (Haffner a kol., 2016). Princip spočívá v kapénkovém rozprašování tekutiny obsahující prebiotikum a enkapsulační matrici v sušící komoře, kde dochází k rychlé evaporaci, jakmile je tekutina vstříknuta do proudu horkého vzduchu. Vytvořené mikročástice jsou poté ochlazeny a následně kolektovány. V rámci této technologie byla vyvinuta řada postupů přípravy mikrokapslí z různého materiálu a různých probiotických bakterií. Ying a kol. (2016) studovali vliv enkapsulační matrice na stabilitu enkapsulovaných probiotik. V tomto případě enkapsulovali *Lactobacillus rhamnosus* v kombinaci s různou koncentrací látek obsažených v matrici. Tyto matrice obsahovaly syrovátkový proteinový hydrolyzát popř. izolát, rezistentní škrob, maltodextrin a slunečnicový olej. Připravené materiály byly poté skladovány v různých podmínkách po dobu jednoho roku, přičemž se sledovala životaschopnost probiotika a další fyzikální parametry připravených materiálů. Vedle velmi komplikovaných maticí byly také prováděny studie umožňující využít danou matrici jako živné medium pro kultivaci probiotik před enkapsulací (Huang a kol., 2017). V tomto případě 30 % sladká syrovátka byla použita pro kultivaci *Lactobacillus casei* a *Propionibacterium freudenreichii*. Následně toto kultivační medium bylo šetrně rozmícháno a kontinuálně dávkováno do sprejové sušárny s několika stupňovým sušením vzniklých mikrokapslí. Vedle maticí na bázi proteinových směsí se využívají také matrice na bázi oligosacharidů. Takovým příkladem je využití laktózy a trehalózy jako matrice pro enkapsulaci *L. rhamnosus*, přičemž autoři studovali vliv Ca^{2+} iontů na míru přežití bakterie po sprejovém sušení (Zheng a kol., 2016). Základním problémem tohoto způsobu enkapsulace je přežívání probiotických bakterií při aplikaci vyšší teploty a také osmotického šoku, po rychlém odpaření kapaliny. Aplikace vyšších teplot vede k inaktivaci mikroorganismů narušením cytoplasmatické membrány, buněčné stěny, ribozómů nebo DNA (Haffner a kol., 2016). Z těchto důvodů se také hledají způsoby ochrany probiotika pomocí přísadků různých sloučenin do matrice. Tímto způsobem lze výrazně ovlivnit životaschopnost probiotik. Princip působení těchto látek většinou spočívá ve stabilizaci buněčných struktur, která vede k vyšší odolnosti vůči vysokým teplotám, které tato technologie vyžaduje při samotném procesu sušení (Huang a kol., 2017; Ying a kol., 2016; Zheng a kol., 2016).

Sprejové chlazení

Zajímavou alternativou výše uvedené technologie je sprejové chlazení. V tomto případě aktivní složka je dispergována v kapalném materiálu, který slouží jako nosič. Tento materiál je poté dispergován do rozprašovací komory s tokem studeného vzduchu, který umožňuje ztuhnouti

materiálu a vytvoření kapsule. Pomocí této techniky lze připravit částice, kde účinná složka se může vyskytovat i na povrchu částice. Výhodou této techniky je její finanční nenáročnost a potenciál průmyslového využití pro probiotika. Dále aplikace nízkých teplot umožňuje využití i pro teplotně citlivé mikroorganismy jako jsou *Bifidobacterium lactis*, *B. longum*, *B. animalis* subsp. *lactis* a *Lactobacillus acidophilus*. (Bampi a kol., 2016; Haffner a kol., 2016; Etchepare a kol., 2016) V rámci materiálů použitelných pro tuto techniku jsou dominantní látky na bázi tuků, lipidů jako jsou např. kakaové máslo (Haffner a kol., 2016), rostlinný tuk (Bampi a kol., 2016; Etchepare a kol., 2016), plně hydrogenovaný palmový olej (Haffner a kol., 2016). Nevýhodou této metodiky je rozpad jádra v částicích během skladování, což má za následek krystalizaci lipidů. Dalším problémem může být příliš rychlé uvolňování probiotik po styku částic s vodou. Tyto nevýhody se snaží řešit přidávkou látek, které stabilizují prostředí mikročásteček, jako jsou inulin nebo polydextróza (Haffner a kol., 2016). Výhodou těchto mikročásteček je snadná stravitelnost ve střevě pomocí lipáz, což způsobí, že mikroorganismy jsou uvolněny v blízkosti místa jejich působení (Etchepare a kol., 2016). Ve srovnání se sprejovým sušením mají částice nižší obsah enkapsulovaného probiotika (Haffner a kol., 2016).

Emulgace

Emulgace využívá emulze, tj. směs dvou i více nemísitelných kapalin, které se promíchají pomocí míchadla. Výhodou emulgace jsou nízké náklady na techniku, alespoň v laboratorním měřítku. Emulgace má obvykle vysoké procento přeživších bakterií, avšak je nutné omezit působení střížných sil během emulgace. Hlavní nevýhodou je nízká uniformita velikosti a tvaru částic, což může ztížit převedení metody do průmyslových rozměrů. Jako základní matrice pro probiotika se používá nejčastěji inulin, karagenan a alginát (Haffner a kol., 2016). Pro tvorbu mikročásteček se používají různé techniky kombinující emulgaci s externí/interní gelací v přítomnosti povrchově aktivních látek (Holkem a kol., 2017). Proces gelace spočívá ve využití vlastností nosné matrice především alginátu, který vytváří zpevněnou strukturu v přítomnosti Ca^{2+} iontů. Externí gelace spočívá ve tvorbě emulze mezi alginátovým roztokem obsahujícím probiotikum a olejovou fází, přičemž do vzniklé emulze se přidávají Ca^{2+} ionty, které umožní zpevnění vytvořených mikročásteček. Interní gelace spočívá ve tvorbě mikročásteček (probiotikum - alginát - Ca^{2+}), které jsou následně rozsuspendovány v oleji (Valero-Cases a Frutos, 2015, Holkem a kol., 2017). Tímto způsobem byl enkapsulován kmen *Bifidobacterium* BB-12 (Holkem a kol., 2017).

Koacervace

Další velmi zajímavou metodou je koacervace, která využívá několik hydrokoloidních systémů jako jsou želatina/arabská guma, chitosan, sojový protein a želatina/karboxymethylcelulóza. Princip koacervace spočívá ve

vyločení polymerních materiálů z roztoku změnou fyzikálních vlastností roztoku, např. zvýšením obsahu solí nebo snížením teploty. Látky, které se přidávají k roztokům, mají vyšší afinitu k vodě než samotný polymer, tudíž způsobují dehydrataci polymeru, a tím jeho vyločení z roztoku. Koacervaci lze dosáhnout poměrně vysokých výtěžků, na druhé straně tento proces je velmi nákladný. Často k tvorbě koacervátů a jejich stabilizaci se využívá síťujících činidel, jako jsou glutaraldehyd nebo různé enzymy. Byla také vyvinuta metoda enkapsulace probiotických bakterií produkující mikročástečky s matricí složené z kaseinu a chitosanu (Haffner a kol., 2016). Analogicky byla popsána enkapsulace/koacervace kmenů *Bifidobacterium lactis* a *Lactobacillus acidophilus* pomocí komplexu kasein/pektin (Etchepare a kol., 2016). Oba kmeny pak vykázaly lepší přežívání při následném procesu sprejového sušení a také vyšší procento přežití v nízkém pH a žlučových kyselinách. Další kombinací systému protein - polysacharid je koacervace pomocí směsi syrovátkových proteinů (3 % w/v) a arabské gumy (3 % w/v), která byla využita pro enkapsulaci probiotických kmenů *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus paraplantarum*. Oba enkapsulované kmeny při testech přežívání v nízkém pH a žlučových kyselinách vykazovaly životaschopnost více než 73 %, přičemž planktonické kmeny pouze 19 % (Bosnea a kol., 2014).

Extruze

Technologie extruze spočívá ve vytlačování suspenze bakterií z trysky, přičemž se vytvrzují při kontaktu s druhým roztokem. Jako nejběžnější příklad lze uvést extruzi roztoku alginátu sodného obsahujícího mikroorganismy, přičemž vytvořené kapky dopadají do roztoku obsahujícího vápenaté ionty. Při styku alginátu s vápenatými ionty dochází k tzv. gelaci, kdy se vytvoří nerozpustná síť alginátu propojená vápenatými ionty. Touto metodou lze vytvořit kapsle až o velikosti 3 mm (Haffner a kol., 2016). V rámci této metody existuje značné množství způsobů vypuzování kapek z trysky, jako jsou kapání samospádem, vypuzování elektrostatickým impulzem, vibracemi apod. Výhodou této techniky je použití nízkých teplot, vznik uniformních částic a možnost kontinuálního procesu tvorby kapslí, což usnadňuje průmyslovou výrobu. Na rozdíl od jiných technologií výsledný materiál je hydratovaný, tudíž lze očekávat nižší míru životnosti v porovnání s dehydratovanými materiály (Haffner a kol., 2016). Další výhodou je tvorba vícevrstvých kapslí, která spolu v kombinaci s protektivními látkami, poskytuje větší ochranu probiotiku. V tomto případě byl studován vliv přídavku kukuřičného škrobu do roztoku alginátu sodného a *Lactobacilla acidophila*, který byl poté enkapsulován vstříknutím do roztoku vápenatých solí a chitosanu. Chitosan po vzniku mikrokapsle vytvořil druhou vrstvu kolem alginátového jádra. Přídavek kukuřičného škrobu do mikrokapslí se projevil větší odolností tohoto materiálu v gastrointestinálním testu ve srovnání s mikrokapslemi vytvořenými bez této látky (Etchepare a kol., 2016). Techniku extruze lze využít

i na tvorbu mikrokapslí obsahujících vhodné živné médium spolu s prebiotikem jako zdrojem energie pro enkapsulovaný mikroorganismus. Valero-Cases a Frutos (2015) vytvořili mikrokapsli z roztoku alginátu sodného obsahujícího MRS medium, glycerol, xanthanovou gumu, inulin a *Lactobacillus plantarum* extruzí do roztoku chloridu vápenatého. Vzniklé mikrokapsle vykazovaly dobrou odolnost při gastrointestinálních testech. Majoritní podíl publikací zabývající se technikou extruze je založen na kombinaci alginátu s probiotiky. Alternativou může být kombinace dvou polymerních sloučenin xanthanové gumy a chitosanu, která vytváří také gelovité mikrokapsle. Tímto způsobem byly vytvořeny mikrokapsle obsahující *Lactobacillus acidophilus*. Základem extruze je kombinace dvou látek, které mají opačný náboj, přičemž při styku těchto látek dochází ke tvorbě gelových struktur (Chen a kol., 2015).

Závěr

Jako jeden z nejlepších způsobů zajištění životaschopnosti a stability probiotik se jeví enkapsulace, jelikož chrání probiotika, a to jak v průběhu zpracování a skladování potravin, tak i při průchodu GIT. Vedle polysacharidů se tradičně používají jako matrice pro enkapsulaci želatina, rostlinné proteiny a mléčné proteiny. Kromě toho jsou testovány nové materiály, přičemž jedním z hlavních cílů je využití synbiotik, což je kombinace probiotik s prebiotiky. V rámci dalšího rozvoje se klade důraz na tvorbu vícevrstevných obalů, které také zvyšují schopnost přežití probiotik při průchodu GIT. Velmi zajímavou možností je tvorba mikrokapslí obsahujících probiotikum s biofilmem, což by také mělo zvýšit možnost interakce probiotika se střevní stěnou v porovnání s planktonickou formou probiotika. Tvorba mikrokapslí je komplexní proces, který ve své struktuře zahrnuje výše zmíněné ochranné prvky, přičemž se klade důraz na rozvoj nových technologií, které by umožnily tvorbu těchto komplexních matic pro probiotika. V akademické sféře jsou nejmasivněji používány technologie sprejového sušení, emulzifikace a extruze, přičemž každá z těchto technologií má svá kritická omezení. Z těchto technologií lze považovat za velmi zajímavou technologii extruze, protože kombinuje mírné podmínky a tvorbu malých kapslí. Modifikací této technologie, která získává větší pozornost, je elektrospřádání a technologie vibrační trysky, v obou případech jsou na trhu zařízení vybavená těmito technologiemi.

Vzhledem k vzrůstající poptávce po potravinách obsahujících probiotika je nyní důležitý rozvoj technologií na industriální úrovni, kdy tvorba mikrokapslí bude představovat kombinaci několika technologických procesů, přičemž snahou by mělo být zjednodušení postupu výroby velmi komplikovaných struktur mikrokapslí.

Literatura

- BAMPI G.B., BACKES G.T., CANSANI R.L., DE MATOS F.E., ANSOLIN I.M.A., POLETO B.C., COREZZOLA L.R., FAVARO-TRINDADE C.S. (2016): Spray chilling microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and its use in the preparation of savory probiotic cereal bars. *Food Bioproc. Technol.* 9, s. 1422-1428.
- BOSNEA L.A., MOSCHAKIS T., BILIADERIS C.G. (2014): Complex coacervation as a novel microencapsulation technique to improve viability of probiotics under different stresses. *Food Bioproc. Technol.* 7, s. 2767-2781.
- CHEN H., SONG Y., LIU N., WAN H., SHU G., LIAO N. (2015): Effect of complexation conditions on microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in xanthan - chitosan polyelectrolyte complex gels. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 14, s. 207-213.
- ETCHEPARE M.A., RADDATZ G.C., FLORES E.M.M., ZEPKA L.Q., JACOB-LOPES E., BARIN J.S., GROSSO C.R.F., DE MENEZES C.R. (2016): Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *LWT Food Sci. Technol.* 65, s. 511-517.
- HAFFNER F.B., DIAB R., PASC A. (2016): Encapsulation of probiotics: insights into academic and industrial approaches. *Mater. Sci.* 3, s. 114-136.
- HOLKEM A.T., RADDATZ G.C., BARIN J.S., FLORES E.M.M., MULLER E.I., CODEVILLA C.F., JACOB-LOPES E., GROSSO C.R.F., MENEZES C.R. (2017): Production of microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 by emulsification/internal gelation. *LWT Food Sci. Technol.* 76, s. 216-221.
- HUANG S., MEJEAN S., RABAH H., DOLIVET A., LOIR Y.L., CHEN X.D., JAN G., JEANTET R., SCHUCK P. (2017): Double use of concentrated sweet whey for growth and spray drying of probiotics: Towards maximal viability in pilot scale spray dryer. *J. Food Eng.* 196, s. 11-17.
- MARTIN M.J., VILLOSLABA F.L., RUIZ M.A., MORALES M.E. (2015): Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotics effects. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27, s. 15-25.
- SALAS-JARA M.S., ILABACA A., VEGA M., GARCIA A. (2016): Biofilm Forming *Lactobacillus*: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganism.* 4, s. 35-49.
- SHI L.E., LI Z.H., LI D.T., XU M., CHEN H.Y., ZHANG Z.L., TANG Z.X. (2013): Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *J. Food Eng.* 117, s. 99-104.
- VALERO-CASES E., FRUTOS M.J. (2015): Effect of different types of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and in vitro digestion. *LWT Food Sci. Technol.* 64, s. 824-828.
- VARANKOVICH N.V., KHAN N.H., NICKERSON M.T., KALMOKOFF M., KORBER D.R. (2015): Evaluation of pea protein-polysaccharide matrices for encapsulation of acid-sensitive bacteria. *Food Res. Int.* 70, s. 118-124.
- YING D.Y., SANGUANSRI L., WEERAKKODY R., BULL M., SINGH T.K., AUGUSTIN M.A. (2016): Effect of encapsulated matrix on stability of microencapsulated probiotics. *J. Funct. Foods.* 25, s. 447-458.
- ZHENG X., FU N., HUANG S., JEANTET R., CHEN X.D. (2016): Exploring the protective effects of calcium-containing carrier against drying-induced cellular injuries of probiotics using single droplet drying technique. *Food Res. Inter.* 90, s. 226-234.

Práce vznikla za podpory projektu QJ1310258.

Přijato do tisku: 15. 4. 2017

Lektorováno: 5. 5. 2017