

طراحی و بهینه‌سازی محافظ انجمادی بر پایه نانوسلولز برای افزایش قابلیت زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس JN368471.1 در طی فرایند خشک کردن انجمادی

فاطمه کیوانی‌نهر^۱، رضا رضائی مکرّم^۲، محمّدامین حجازی^۳، بابک قنبرزاده^۴، محمود صوتی خیابانی^۲، خالد ظروفچی بنیس^۵

- ۱- دانشجوی دکترای گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
- ۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
- * نویسنده مسئول (rmokarram@tabrizu.ac.ir)
- ۳- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب و غرب کشور
- ۴- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
- ۵- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب و غرب کشور

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۸

چکیده

خشک کردن انجمادی بهترین روش تولید کشت‌های پروبیوتیکی آماده برای تلقیح مستقیم است اما کاهش زنده‌مانی در این روش وجود دارد. اصلی‌ترین علت کاهش زنده‌مانی، آسیب‌های ناشی از انجماد بر سلول‌ها است که برای جلوگیری از این آسیب‌ها از مواد محافظ استفاده می‌شود. برای بهینه‌سازی محیط خشک کردن انجمادی حاوی مواد محافظ نانوسلولز، شیر پس‌چرخ و ترهالوز، از طرح آماری روش سطح پاسخ (طرح مرکب مرکزی) استفاده شد. برای تعیین اندازه ذرات، نانوسلولز تولید شده از لینتر پنبه از میکروسکوپ نیروی اتمی و میکروسکوپ الکترونی نگاره استفاده شد. طول نانوذرات تولیدی از حدود صد نانومتر تا چندین میکرومتر و قطر ذرات ۵ تا ۵۰ نانومتر بود. باکتری لاکتوباسیلوس برویس بومی آذربایجان به عنوان باکتری هدف انتخاب شد. با آنالیز نمودارهای سطح پاسخ، غلظت بهینه مواد محافظ به صورت ۱۳/۷۵٪ شیر پس-چرخ، ۲۰/۵٪ ترهالوز و ۱۳/۷۵٪ نانوسلولز به دست آمد. اثر محافظتی بالای نانوسلولز را می‌توان به توانایی آن در جذب آب، جلوگیری از رشد کریستال‌های یخ و در نتیجه ایجاد فاز شیشه‌ای مربوط دانست. نتایج پژوهش نشان داد که RSM علاوه بر دستیابی غلظت بهینه عوامل محافظ، قادر به ارزیابی‌های اصلی و اثر متقابل عوامل محافظ در زنده‌مانی سلول‌ها نیز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

خشک کردن انجمادی
لاکتوباسیلوس برویس
محافظت کننده انجمادی
نانوسلولز

مقدمه

pH پایین، فعالیت اسیدی و فعالیت پروبیوتیکی نشان داده است که این باکتری می‌تواند به عنوان یک کشت پروبیوتیک در تولید محصولات غذایی و دارویی به کار برده شود (Rushdy & Gomaa, 2013). افزایش تقاضا

اسید لاکتیک باکتری‌ها به عنوان نگهدارنده‌های زیستی طبیعی در غذاهای تخمیری استفاده می‌شوند. بررسی حساسیت لاکتوباسیلوس برویس به آنتی-بیوتیک‌ها، تحمل نمک‌های صفرای، مقاومت در برابر

شده و یک لایه چسبناک تشکیل دهد. این لایه با افزایش ویسکوزیته محلول مانع از رشد کریستال‌های یخ می‌شود و نیز در شرایط انجماد ساختار شیشه‌ای از آب را در نزدیکی سلول نگه می‌دارد (Hubalek, 2003). ابعاد نانومتری سلولز می‌تواند به ایفای بهتر نقش محافظت‌کنندگی کمک کرده و با افزایش ویسکوزیته مانع از هسته‌زایی و تشکیل کریستال‌های یخ شود (Syverud et al., 2011).

در این تحقیق بهینه‌سازی محیط محافظ انجمادی حاوی نانوسلولز، شیر پس‌چرخ و ترهالوز به منظور دستیابی به بالاترین زنده‌مانی سلول‌های لاکتوباسیلوس برویس با استفاده از طرح مرکب مرکزی^۱ انجام شد و به منظور حذف عوامل ناشناخته خارجی احتمالی ناشی از منشأ و مرحله تولید نانوسلولز که ممکن است بر زنده‌مانی اثر مثبت یا منفی داشته باشند از نوع تجاری استفاده نشد و نانوسلولز با استفاده از تلفیق فرآیند شیمیایی و مکانیکی از لینتر پنبه تولید شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ابتدا نانوسلولز از طریق هیدرولیز شیمیایی با اسید سولفوریک و تیمار مکانیکی با توراکس و فراصوت از لینتر پنبه تهیه شد و با روش‌های میکروسکوپی ابعاد ذرات تولید شده معین گردید. مواد محافظ در نسبت‌های تعیین شده توسط طراحی آزمایش RSM مخلوط شدند. تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف مواد محافظ انجمادی (شامل شیر پس-چرخ، ترهالوز و نانوسلولز) به توده سلولی اضافه شدند و انجماد و سپس خشک کردن انجمادی انجام شد. تعیین شمارش سلولی در دو مرحله پیش از انجماد و پس از خشک کردن انجمادی به روش کشت سطحی در MRS آگار تعیین گردید.

تولید سوسپانسیون نانوسلولز

هیدرولیز اسیدی با استفاده از اسید سولفوریک و سپس خردکردن مکانیکی، روش معمول تهیه نانو سلولز است (Beck-Candanedo et al., 2005; Araki et al., 1999; Favier et al., 1995). در این پژوهش،

برای پروبیوتیک‌ها، صنعت را برای تولید مقادیر بالایی از کشت‌های پروبیوتیک به چالش کشیده است (Charalampopoulos & Rastall, 2009; El-Nezami et al., 1998).

عوامل متعددی از جمله گونه، نژاد، شکل و اندازه-سلول، سرعت و فاز رشد، ترکیب و محتوای لیپیدی سلول بر محافظت سرمایی میکروارگانیسم‌ها مؤثرند. یکی از مهم‌ترین فاکتورهای تأثیرگذار، ترکیب محیط استفاده شده برای انجماد میکروارگانیسم است (Hubalek, 2003). شیر پس‌چرخ به عنوان یک عامل محافظ انجمادی مؤثر برای باکتری‌ها دارای کاربرد گسترده‌ای است (Schwab et al., 2007; Otero et al., 2007; Zayed & Roos, 2004; Palmfeldt et al., 2003). همچنین قندهایی از قبیل ساکاروز، ترهالوز، لاکتوز و سوربیتول (Foerst et al., 2012; Otero et al., 2007; Schoug et al., 2006; Zayed and Roos, 2003; Palmfeldt et al., 2004) و بیوپلیمرها و لیگوساکاریدها نیز می‌توانند نرخ زنده‌مانی بالایی را طی فرآیند خشک کردن انجمادی فراهم کنند (Tymczyszyn et al., 2012; Jagannath et al., 2010; Schwab et al., 2007; Saarela et al., 2006; Capela et al., 2006).

فیبرهای سلولز دسته‌هایی از میکروفیبریل‌ها هستند که در آن مولکول‌های سلولز به صورت طولی توسط پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های هیدروکسیلی خود به هم وصل شده‌اند. میکروفیبریل‌ها شامل نواحی تک کریستالی سلولز هستند که به نواحی آمورف متصل شده‌اند. هر فیبریل ۱۰-۵ نانومتر قطر و طولی در حدود چند صد نانومتر تا چندین میکرومتر دارد. منشأ نانوسلولز و تیمار اعمال شده بر نوع و کیفیت محصول بدست آمده مانند ضخامت الیاف دانسیته تراکمی آنها، نفوذپذیری نسبت به اکسیژن، ویسکوزیته و میزان جذب آب تأثیر مستقیم دارد (Aulin et al., 2009; Labet & Thielemans, 2011; Missoum et al., 2013; Peng et al., 2011). در حین هیدرولیز اسیدی سلولز، میکروفیبریل‌ها متحمل شکستگی در نواحی آمورف شده و سلولز کریستالی (نانوسلولز) رها می‌شود (Oksman et al., 2006).

به نظر می‌رسد که نانوسلولز مانند دیگر پلی-ساکاریدها می‌تواند در سطح میکروارگانیسم جذب

میکروسکوپ الکترونی نگاره^۲: در این پژوهش برای بررسی ریزساختار و مورفولوژی سطحی، نانوذرات سلولزی تحت خلأ خشک شدند و با پلاتینوم-پالادیوم پوشش داده شدند و با میکروسکوپ الکترونی نگاره (FESEM)، با ولتاژ ۱/۵ کیلوولت و فاصله کاری^۳ معادل ۶/۶ میلی متر اسکن گردیدند.

اعمال تیمارها و خشک کردن توده سلولی

باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس برویس (JN368471.1) از کلکسیون میکروبی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور تهیه شد. ۵۰۰ میلی لیتر کشت مایع با تلقیح ۲٪ حجمی-حجمی از سویه لاکتوباسیلوس برویس منجمد شده با گلیسرول در محیط کشت MRS-broth (Merck, Germany) تهیه شد. محیط کشت حاوی توده سلولی بعد از ۲۴ ساعت (در انتهای فاز لگاریتمی و آغاز سکون) گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتیگراد با استفاده از سانتریفوژ یخچال دار (Allerga, X-22R) در ۱۵۰۰g به مدت ۲۵ دقیقه و در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید و سپس طی دو مرحله با استفاده از سرم فیزیولوژیک در همان شرایط توسط سانتریفوژ شست و شو گردید (Otero *et al.*, 2007). به هر صد میکرولیتر از توده سلولی حاصله یکی از تیمارهای طراحی شده اعمال شد و درصدهای تعیین شده از مواد محافظ انجمادی از جمله سوسپانسیون نانوسلولز، شیر پس چرخ و ترهالوز (جدول ۱ و ۲) به عنوان محیط محافظ افزوده شد. محیط‌های حاوی سلول‌ها بعد از دو ساعت قرارگیری در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد به خشک‌کن انجمادی انتقال یافتند. فشار خشک‌کن معادل ۰/۰۲ بار بود. مرحله اول خشک کردن به مدت ۴۰ ساعت در دمای ۱۸ درجه سانتیگراد و مرحله دوم به مدت ۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انجام شد. جهت محاسبه زنده‌مانی شمارش سلول‌ها قبل و بعد از انجماد در سه تکرار از کشت سطحی در MRS استفاده شد (Schoug *et al.*, 2006).

نانوسلولز با استفاده از تیمارهای شیمیایی و مکانیکی تهیه شد. بدین منظور ابتدا ۱۰ گرم لینتر پنبه ریز شده به منظور افزایش درجه خلوص، در محلول ۲٪ وزنی هیدروکسید سدیم به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق همزنی شد. سپس شست و شو با آب مقطر تا خنثی‌سازی لینتر انجام شد. نقطه خنثی‌سازی با بی-رنگ شدن فنل‌فالتین تعیین گردید. الیاف خنثی شده آب‌گیری شده و برای هیدرولیز اسیدی آماده گردیدند. به منظور اعمال تیمار شیمیایی ۱۷ برابر جرم الیاف پنبه، اسید سولفوریک ۶۴٪ وزنی افزوده شد و ۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد تحت هیدرولیز قرار گرفت. بعد از اتمام زمان هیدرولیز، حدود دو برابر حجم اسید، آب مقطر برای اتمام واکنش به سوسپانسیون اضافه شد. جهت حذف اسید، سانتریفوژ کردن در ۱۵۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس مایع بالایی تخلیه شد و با آب مقطر جایگزین گردید. سانتریفوژ کردن در همان شرایط به صورت متوالی تا رسیدن pH سوسپانسیون به ۷ انجام شد. جهت اعمال تیمار مکانیکی شدید برای خردتر کردن ذرات، سوسپانسیون خنثی شده، توسط توراکس ۱۸۰۰۰ rpm به مدت یک ساعت هموژن شد. با توجه به این‌که اندازه ذرات به دست آمده تا این مرحله طیف وسیعی دارد و همچنین به جهت جداسازی ذرات کلوخه شده، عمل‌آوری با فراصوت (AS ONE, USD 4R, Japan) در توان ۴۰ Kw به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد (Li *et al.*, 2013; Morais *et al.*, 2012). سوسپانسیون حاصله حداقل به مدت یک هفته در دمای ۴ درجه سانتیگراد پایدار بود.

تعیین اندازه ذرات سلولز

ریزننگاره نیروی اتمی^۱: جهت تعیین اندازه ذرات نانوسلولز به دست آمده، ریزنگاره‌های نیروی اتمی با استفاده از میکروسکوپ Nanonavi E-sweep در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۴۵-۵۵٪ تهیه شد. پروب Si از نوع Si-DF20 (SII Nano technology, Inc., Japan) با ثابت نوسان ۱۸ نیوتن بر متر و فرکانس ۱۳۸ کیلو هرتز بود.

2- Field Emission Scanning
Electron Microscope (FESEM)
3- Working Distance (WD)

1- Atomic Force Microscope (AFM)

طرح آماری آزمایش‌ها

در این تحقیق از طرح مرکب مرکزی با ۱۸ آزمایش که شامل ۴ آزمایش در نقطه مرکزی است، استفاده گردید. اثرات تغییرپذیری غیرقابل توجیه در پاسخ مشاهده شده، به علت عامل‌های خارجی، به وسیله تصادفی کردن ترتیب آزمایش‌ها کاهش داده

شد. متغیرهای مستقل طرح در پنج سطح شامل غلظت شیر پس‌چرخ (X_1 ، درصد جرمی-حجمی)، غلظت ترهالوز (X_2 ، درصد جرمی-حجمی) و غلظت نانوسلولز (X_3 ، درصد جرمی-حجمی) و متغیر وابسته (Y) میزان زنده‌مانی بعد از اعمال فرآیند (واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر میلی‌لیتر) بودند (جدول ۱).

جدول ۱- متغیرهای اصلی در پنج سطح جهت تعیین میزان پاسخ

سطوح متغیر			واحد	نوع متغیر	
-۱/۶۸	-۱	۰	+۱	+۱/۶۸	متغیرهای کد دار
۱/۵۵	۶/۵	۱۳/۷۵	۲۱	۲۶	غلظت شیر پس‌چرخ (X_1) درصد جرمی-حجمی
۱/۱۵	۹	۲۰/۵	۳۲	۴۰	غلظت ترهالوز (X_2) درصد جرمی-حجمی
۱/۵۵	۶/۵	۱۳/۷۵	۲۱	۲۶	غلظت نانوسلولز (X_3) درصد جرمی-حجمی

نتایج و بحث

نتایج بررسی مشخصات نانوفیبر سلولز تولید شده

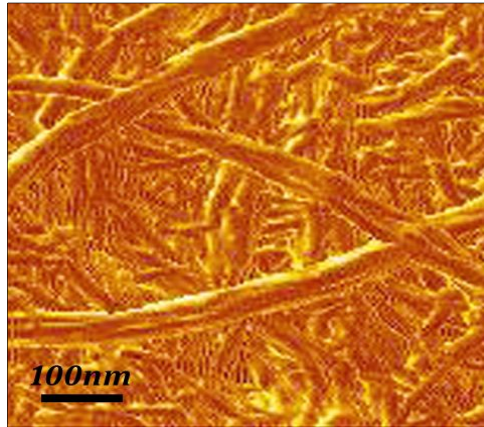
ذرات سلولزی قبل از تیمار اسیدی و مکانیکی در آب حل نمی‌شوند و به دلیل اندازه بزرگ ذرات، رسوب می‌کنند. پس از تیمار با اسید سولفوریک سوسپانسیون میکروکریستال‌های سلولزی به دست آمد. سپس تیمار مکانیکی توسط هموژنایزر فشار بالا و اولتراسوند اعمال شد و سوسپانسیون تبدیل به یک کلئوئید شد. این کلئوئید ظاهر سفید رنگی داشت که دارای خاصیت کدورت (پخش نور) بود. تصویر مرفولوژی ذرات نانوسلولز تهیه شده توسط ریز نگاره نیروی اتمی در شکل ۱ نشان داده شده است. تیمار شیمیایی و مکانیکی کرک پنبه باعث تولید نانوفیبر سلولز با قطر بین ۵ تا ۵۰ نانومتر و طول صد نانومتر تا چند میکرومتر شد.

نرم افزار SAS 9.1 برای تجزیه و تحلیل داده‌های آماری مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های آزمایشی با معادله چند جمله‌ای درجه دوم تطبیق داده شد و ضریب همبستگی محاسبه شد. معادله چند جمله‌ای درجه دوم استفاده شده در تجزیه و تحلیل به صورت زیر است:

معادله (۱)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i < j}}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

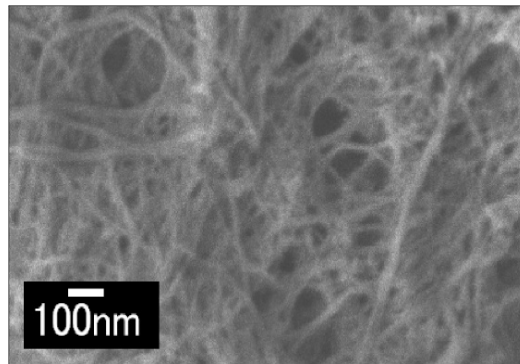
که در این فرمول Y متغیر وابسته، β_0 ، β_i ، β_{ii} و β_{ij} به ترتیب ضرایب رگرسیون برای عوامل ضریب ثابت (عرض از مبدأ)، ضریب اثر خطی، ضریب اثر درجه دوم و ضریب اثر متقابل می‌باشند و X_i و X_j متغیرهای مستقل هستند. نرم افزار آماری-Statistica 10 برای ایجاد سطوح پاسخ در حالی مورد استفاده قرار گرفت که یک متغیر در معادله چند جمله‌ای درجه دوم ثابت نگه داشته شده بود.



شکل ۱- تصویر تهیه شده از نانوسلولز توسط ریز نگاره نیروی اتمی

ذرات کمتر از ۵۰ نانومتر و طول آنها بین صد نانومتر تا چندین میکرومتر بود.

در تصویر تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (شکل ۲) نانوسلولز یک توده متخلخل با الیاف در هم تنیده و سطحی صاف و نرم مشاهده شد. عرض



شکل ۲- تصویر تهیه شده از نانوسلولز توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره

نتایج بهینه‌سازی محیط محافظ انجمادی روش سطح پاسخ^۱ (RSM) مجموعه‌ای از تکنیک‌های ریاضی و آماری بوده که برای مدل‌سازی و تجزیه و تحلیل مسائلی مورد استفاده قرار می‌گیرد که در آن پاسخ مورد نظر، با هدف بهینه‌سازی پاسخ، تحت تأثیر چندین متغیر مختلف است. هدف از روش سطح پاسخ (RSM)، بهینه‌سازی است، به عبارت دیگر هدف یافتن بهترین مجموعه از سطوح عامل برای رسیدن به بعضی ویژگی‌های خاص می‌باشد. این روش مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی براساس انطباق معادلات چند جمله‌ای با داده‌های آزمایشی است که باید رفتار مجموعه داده‌ها را با

عرض ذرات نانوسلولز تولیدی کمتر از ۵۰ نانومتر و طول آنها بین صد نانومتر تا چندین میکرومتر بود که با گزارش‌های موجود در منابع تحقیقاتی مشابهت داشت. شکل متخلخل مساحت سطح را افزایش می‌دهد و بنابراین نانوسلولز واکنش‌پذیری بیشتری نسبت به فیبر پنبه معمول خواهد داشت. شکل صاف سطح سبب افزایش سطح مخصوص می‌شود که برای واکنش‌های شیمیایی مطلوب خواهد بود (Cao *et al.*, 2013; Sczostak, 2009).

1- Response Surface Methodology (RSM)

میزان زنده‌مانی 0.34×10^9 و 1.54×10^9 واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر به ترتیب در نمونه شماره ۱ (غلظت شیر پس‌چرخ ۱۳/۷۵٪، ترهالوز ۱/۱۵٪ و نانوسولوز ۱۳/۷۵٪) و در نمونه شماره ۱۸ (غلظت شیر پس‌چرخ ۱۳/۷۵٪، ترهالوز ۲۰/۵٪ و نانوسولوز ۱۳/۷۵٪) مشاهده شد. با توجه به این‌که تعداد سلول‌های زنده شمارش شده لاکتوباسیلوس برویس قبل از انجماد $2/9 \times 10^9$ واحد تشکیل دهنده کلنی بر میلی‌لیتر بود، درصد زنده‌مانی با استفاده از معادله (۲) تعیین شد.

معادله (۲)

$$100 \times \frac{\text{تعداد سلول‌های شمارش شده قبل از اعمال فرآیند}}{\text{تعداد سلول‌های زنده مانده بعد از اعمال فرآیند}} = \text{درصد زنده‌مانی}$$

هدف پیش‌بینی آماری توضیح دهد (Bezerra et al., 2008). این روش برای مدل‌سازی، بهبود و بهینه‌سازی شرایط در انواع مختلف پروسه‌های علوم زیستی نیز مناسب است (Khuri, 2006).

با توجه به اثر مواد محافظ بر روی زنده‌مانی سلول‌های باکتریایی در طول فرآیند انجماد، یکی از فاکتورهایی که می‌تواند زنده‌مانی سلول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد، غلظت مواد محافظت کننده مورد استفاده قبل از انجماد است. نتایج آزمایش تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف شیر پس‌چرخ، ترهالوز و نانوسولوز روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از خشک شدن در خشک‌کن انجمادی در جدول ۲ آورده شده است. با توجه به کمترین و بیشترین

جدول ۲- تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ، ترهالوز و نانوسولوز بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس خشک شده به روش انجمادی

شماره تیمار	شیر پس‌چرخ (درصد جرمی)	ترهالوز (درصد جرمی)	نانوسولوز (درصد جرمی)	زنده‌مانی* (درصد)
۱	۶/۵	۹	۶/۵	۱۱/۷۲
۲	۶/۵	۹	۲۱	۳۰
۳	۶/۵	۳۲	۶/۵	۳۹/۶۵
۴	۶/۵	۳۲	۲۱	۳۵/۸۶
۵	۲۱	۹	۶/۵	۱۸/۹۶
۶	۲۱	۹	۲۱	۵۱/۷۲
۷	۲۱	۳۲	۶/۵	۴۳/۴۴
۸	۲۱	۳۲	۲۱	۵۱/۷۲
۹	۱/۵۵	۲۰/۵	۱۳/۷۵	۳۱/۳۷
۱۰	۲۶	۲۰/۵	۱۳/۷۵	۳۵/۵۱
۱۱	۱۳/۷۵	۱/۱۵	۱۳/۷۵	۲۶/۵۵
۱۲	۱۳/۷۵	۴۰	۱۳/۷۵	۴۳/۱۰
۱۳	۱۳/۷۵	۲۰/۵	۱/۵۵	۲۴/۴۸
۱۴	۱۳/۷۵	۲۰/۵	۲۶	۴۱/۳۷
۱۵	۱۳/۷۵	۲۰/۵	۱۳/۷۵	۵۰
۱۶	۱۳/۷۵	۲۰/۵	۱۳/۷۵	۵۵/۱۷
۱۷	۱۳/۷۵	۲۰/۵	۱۳/۷۵	۴۶/۲۰
۱۸	۱۳/۷۵	۲۰/۵	۱۳/۷۵	۵۳/۱۰

* اعداد به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد آورده شده است.

نانوسولوز (X_2) بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس (Y) بعد از خشک شدن به روش انجمادی با

مدل به دست آمده برای پیش‌بینی تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ (X_1)، غلظت ترهالوز (X_2) و غلظت

شکل ۳ تأثیر سطوح مختلف شیر پس‌چرخ و ترهالوز را روی میانگین میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از خشک شدن به روش انجمادی ($10^6 \times$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر میلی-لیتر) نشان می‌دهد. نتایج نشان دادند که با افزایش غلظت شیر پس‌چرخ و ترهالوز تا مقادیر متوسط، میزان زنده‌مانی سلول‌های لاکتوباسیلوس برویس خشک شده به روش انجمادی به طور پیوسته افزایش یافت، اما فراتر از این غلظت به آرامی کاهش یافته همان طور که در شکل مشاهده می‌شود، بیشترین میزان زنده‌مانی بعد از خشک کردن انجمادی در مقادیر متوسط شیر پس‌چرخ و ترهالوز حاصل می‌شود. نتایج آزمایش‌های Abadias و همکاران (۲۰۱۱) نشان داده است که با افزایش غلظت ترهالوز از ۱ تا ۱۰ درصد، زنده‌مانی کاندیدا/سیک^۱ بعد از خشک کردن افزایش می‌یابد. این امر احتمالاً به این دلیل است که با افزایش غلظت شیر پس‌چرخ و ترهالوز لایه محافظت‌کنندگی بهتری بر روی غشای سلول‌های باکتریایی ایجاد می‌شود ولی بعد از عبور از یک غلظت بهینه، به دلیل افزایش بیش از حد فشار اسمزی در محیط بین سلولی، آب سلول به خارج نشت می‌کند و باعث پلاسمولیز و مرگ سلولی می‌شود.

Otero و همکاران (۲۰۰۷) تحقیقی را برای بهینه کردن محیط خشک کردن انجمادی لاکتوباسیلوس گاسری و لاکتوباسیلوس دلبروکی انجام دادند. لاکتوباسیلوس گاسری CRL ۱۴۲۱ مقاومت بسیار بالاتری نسبت به CRL ۱۴۱۲ داشت. لاکتوباسیلوس گاسری ۱۴۲۱ تلقیح شده در شیر پس‌چرخ مقاومت بالاتری را نسبت به تلقیح در آب نشان داد. لاکتوز و ساکارز زنده‌مانی را پس از لیوفیلیزه کردن، به طور معنی‌داری افزایش ندادند.

حذف عوامل غیر معنی‌دار به صورت زیر به دست می‌آید:

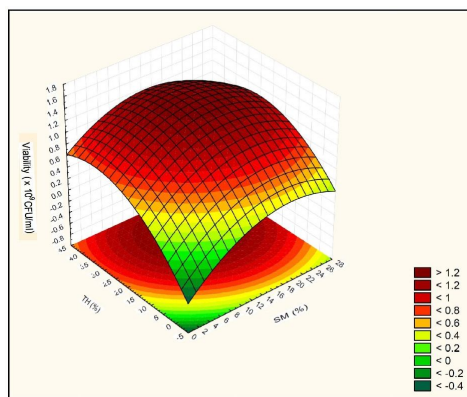
$$Y = -1414/5 + 84/87 X_1 + 95/5 X_2 + 129/1 X_3 - 3/1 X_1 X_2 - 1/13 X_2 X_3 - 2/3 X_1 X_3 - 3/2 X_2 X_3$$

مقادیر P برای مدل ($P < 0.01$) و برای عدم تطابق داده‌ها با مدل (۰/۳۴) تأییدی بر تطابق خوب مدل با داده‌های آزمایشی به دست آمده دارد و اجزای مدل ($X_1, P < 0.05$), ($X_2, P < 0.01$), ($X_3, P < 0.01$) و ($X_1^2, P < 0.01$), ($X_2^2, P < 0.01$), ($X_3^2, P < 0.01$) معنی‌دار بودند.

ضرایب و مقادیر P مدل نشان می‌دهد که میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از خشک شدن انجمادی به طور زیادی به غلظت ترهالوز و نانوسلولز بستگی داشت ($P < 0.01$). اثر درجه دوم متغیرها نشان می‌دهد که با افزایش درجه دوم غلظت شیر پس‌چرخ، ترهالوز و نانوسلولز، میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از خشک شدن انجمادی افزایش می‌یابد ($P < 0.01$), همچنین اثر متقابل متغیرها نشان می‌دهد که با افزایش متقابل غلظت ترهالوز و نانوسلولز، میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از خشک شدن انجمادی افزایش می‌یابد ($P < 0.01$).

مقدار عددی ضریب تبیین R^2_{adj} برای مدل رگرسیونی به دست آمده ۷۴/۴۶٪ بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مدل رگرسیونی توانسته رابطه بین متغیرهای مستقل (غلظت شیر پس‌چرخ، ترهالوز و نانوسلولز) و متغیر وابسته (میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از خشک شدن انجمادی) را نشان دهد و پیش‌بینی کند.

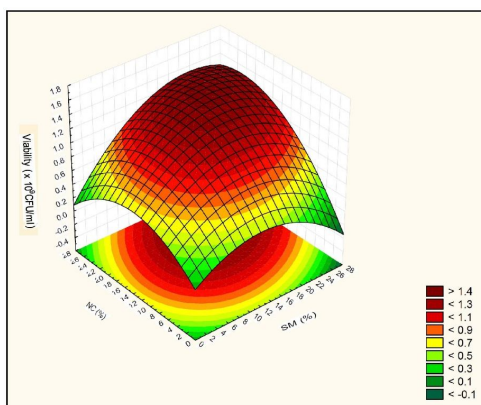
جهت تعیین نمودار تغییرات میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از خشک شدن به روش انجمادی با تغییر متغیرهای مستقل، سه منحنی سطح پاسخ سه بعدی رسم شدند که در آن متغیر وابسته (میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از خشک شدن انجمادی) بر محور Z در مقابل هر دو متغیر مستقل، در حالی که سایر متغیرها در مقادیر بهینه-شان نگه داشته شوند، ترسیم شدند.



شکل ۳- نمودار سطح پاسخ تأثیر غلظت شیر پس چرخ (SM) و ترهالوز (TH) بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد خشک کردن انجمادی. پاسخ به صورت میانگین سلول‌های زنده شمارش شده ($10^9 \times$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر میلی‌لیتر) آورده شده است.

ایجاد ثبات در ترکیبات غشای سلولی و ایجاد یک ساختار متخلخل در محصولات خشک شده مربوط دانست. علاوه بر این، شیر حاوی پروتئین‌هایی است که یک پوشش محافظ برای سلول‌ها طی خشک شدن ایجاد می‌کند (Huang *et al.*, 2006). به نظر می‌رسد که نانوسلولز مانند دیگر پلی‌ساکاریدها می‌تواند در سطح میکروارگانیسم جذب شده و یک لایه چسبناک تشکیل دهد. این لایه با افزایش ویسکوزیته محلول و انتشار بخشی از آب از سلول‌ها مانع از رشد کریستال‌های یخ می‌شود و نیز ساختار شیشه‌ای از یخ را در نزدیکی سلول نگه می‌دارد (Hubalek, 2003). ابعاد نانومتری نانوسلولز می‌تواند به ایفای بهتر نقش محافظت‌کنندگی کمک کرده و با تجمع روی هسته‌های کریستالی از رشد آنها جلوگیری کند.

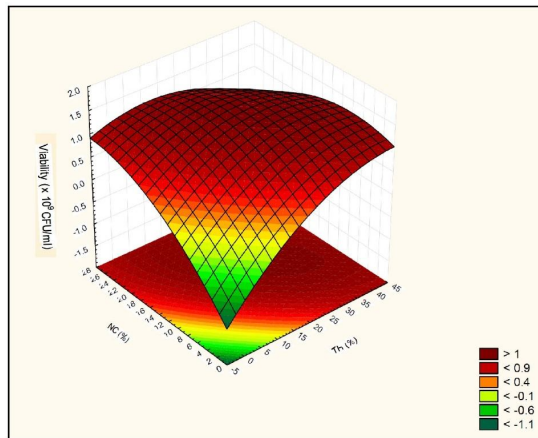
شکل ۴ تأثیر سطوح مختلف شیر پس چرخ و نانوسلولز را روی میانگین میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از خشک شدن به روش انجمادی ($10^9 \times$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر میلی‌لیتر) نشان می‌دهد. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود، بیشترین میزان زنده‌مانی در مقادیر متوسط شیر پس چرخ و نانوسلولز حاصل می‌شود. این نتایج با یافته‌های Huang و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت دارد که نشان دادند افزایش غلظت شیر پس چرخ تا مقدار بهینه باعث افزایش زنده‌مانی تا ۴۴/۳٪ شد. شیر پس چرخ به دلیل اثر محافظت‌کنندگی انجمادی مناسب‌ترین محیط برای انجماد و خشک کردن انجمادی سلول‌ها است. اثر مثبت شیر پس چرخ در خشک کردن میکروارگانیسم‌ها را می‌توان به ظرفیت آن برای



شکل ۴- نمودار سطح پاسخ تأثیر غلظت شیر پس چرخ (SM) و نانوسلولز (NC) بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد خشک کردن انجمادی. پاسخ به صورت میانگین سلول‌های زنده شمارش شده ($10^9 \times$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر میلی‌لیتر) آورده شده است.

ساکاروماپسیس سرویزیه بررسی کردند. در فاز رشد ثابت، ترهالوز موجب افزایش زنده‌مانی سلول‌ها در طول انجماد طولانی شد در حالی که در انجماد اعمال شده به مدت زمان کوتاه ترهالوز تأثیری در افزایش زنده‌مانی سلول‌های منجمد شده نداشت. در فاز لگاریتمی دمای هسته‌بندی کریستال‌های یخ در زنده‌مانی سلول‌ها، مؤثرتر از حضور ترهالوز بود.

شکل ۵ تأثیر سطوح مختلف ترهالوز و نانوسلولز را روی میانگین میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از خشک شدن به روش انجمادی ($10^9 \times$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر میلی‌لیتر) نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، بیشترین میزان زنده‌مانی در مقادیر متوسط ترهالوز و نانوسلولز حاصل می‌شود. Nakamura و همکاران (۲۰۰۹) اثر محتوای ترهالوز را بر زنده‌مانی سلول‌های



شکل ۵- نمودار سطح پاسخ تأثیر غلظت ترهالوز (TH) و نانوسلولز (NC) بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از خشک کردن انجمادی. پاسخ به صورت میانگین سلول‌های زنده شمارش شده ($10^9 \times$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر میلی‌لیتر) آورده شده است.

$10^9 \times 1/93 \pm 0/05$ و $10^9 \times 0/28 \pm 1/85$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر میلی‌لیتر به دست آمد. این نتایج اعتبار مدل را تایید کرده و نشان دادند که مقادیر آزمایشی نزدیک به مقادیر پیش‌بینی شده بودند. محاسبه انحراف از میانگین با استفاده از معادله (۳) انجام شد و مقدار $0/04$ به دست آمد.

$$D = \frac{X_2 - X_1}{X_1} \quad (3) \text{ معادله}$$

D: انحراف از میانگین، X_1 میزان زنده‌مانی پیش‌بینی شده، X_2 میزان زنده‌مانی حاصل از آزمایش

نتیجه‌گیری

ضرایب و مقادیر P مدل نشان داد که میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از خشک شدن به روش انجمادی به طور زیادی به غلظت نانوسلولز بستگی دارد ($P < 0/01$). اثر درجه دوم متغیرها نیز

شرایط عملکرد بهینه حاصل از شکل درجه دوم مدل RSM برای بیشترین میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از انجماد، غلظت شیر پس-چرخ $13/75\%$ ، غلظت ترهالوز $20/5\%$ و غلظت نانوسلولز $13/75\%$ تعیین شد.

اعتبارسنجی مدل پیش‌بینی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد خشک کردن انجمادی

برای تعیین اعتبار مدل آماری و معادله همبستگی ایجاد شده، اعمال تیمارهای مواد محافظ انجمادی در شرایط بهینه متغیرهای غلظت شیر پس‌چرخ، ترهالوز و نانوسلولز به ترتیب $13/75\%$ ، $20/5\%$ و $13/75\%$ انجام شده و میزان زنده‌مانی بعد از فرآیند در این شرایط تعیین شد. تحت شرایط بهینه بدست آمده، میزان زنده‌مانی پیش‌بینی شده و مقدار آزمایشی مشاهده شده برای لاکتوباسیلوس برویس به ترتیب

نشان داد که با افزایش درجه دوم غلظت شیر پس-چرخ و ترهالوز میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از انجماد افزایش یافت. نتایج پژوهش نشان داد که RSM علاوه بر دستیابی به غلظت بهینه عوامل محافظ به منظور بالاترین زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس در طی خشک شدن، قادر به ارزیابی‌های اصلی و اثر متقابل عوامل محافظ در زنده‌مانی سلول‌ها نیز می‌باشد.

منابع

- 1-Abadias, M., Benabarre, A., Teixido, N., Usall, J., & Vinas, I. 2001. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. International Journal of Food Microbiology, 65: 173-182.
- 2-Araki, J., Wada, M., Kuga, S., & Okano, T. 1999. Influence of surface charge on viscosity behavior of cellulose microcrystal suspension. Journal of Wood Science, 45 (3): 258-261.
- 3-Aulin, C., Ahola, S., Josefsson, P., Nishino, T., Hirose, Y., Osterberg, M., & Wagberg, L. 2009. Nanoscale cellulose films with different crystallinities and mesostructures. Their surface properties and interaction with water. Langmuir, 25: 7675-7685.
- 4-Beck-Candanedo, S., Roman, M., & Gray, D. G. 2005. Effect of reaction conditions on the properties and behavior of wood cellulose nanocrystal suspensions. Biomacromolecules, 6 (2): 1048-1054.
- 5-Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escalera, L. A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry: review. Talanta, 76: 965-977.
- 6-Cao, X., Xu, C., Liu, Y., & Chen, Y. 2013. Preparation and properties of carboxylated styrene-butadiene rubber/cellulose nanocrystals composites. Carbohydrate Polymers, 92 (1): 69-76.
- 7-Capela, P., Hay, T., & Shah, N. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Research International, 39 (2): 203-211.
- 8-Charalampopoulos, D., & Rastall, R. A. 2009. Prebiotics and probiotics science and technology, Springer New York.
- 9-El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., & Ahokas, J. 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. Food and Chemical Toxicology, 36 (4): 321-326.
- 10-Favier, V., Chanzy, H., & Cavaille, J. 1995. Polymer nanocomposites reinforced by cellulose whiskers. Macromolecules, 28 (18): 6365-6367.
- 11-Foerst, P., Kulozik, U., Schmitt, M., Bauer, S., & Santivarangkna, C. 2012. Storage stability of vacuum-dried probiotic bacterium *Lactobacillus paracasei* F19. Food and Bioprocess Processing, 90 (2): 295-300.
- 12-Huang, L., Lu, Z., Yuan, Y., Lü, F., & Bie, X. 2006. Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on response surface methodology. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33 (1): 55-61.
- 13-Hubalek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology, 46 (3): 205-229.
- 14-Jagannath, A., Raju, P., & Bawa, A. 2010. Comparative evaluation of bacterial cellulose (nata) as a cryoprotectant and carrier support during the freeze drying process of probiotic lactic acid bacteria. LWT-Food Science and Technology, 43 (8): 1197-1203.
- 15-Khuri, A. I. 2006.. Response surface methodology and related topics, World Scientific Publishing Co., Singapore.

- 16-Labet, M., & Thielemans, W. 2011. Improving the reproducibility of chemical reactions on the surface of cellulose nanocrystals: ROP of ϵ -caprolactone as a case study. *Cellulose*, 18: 607-617.
- 17-Li, W., Yue, J., & Liu, S. 2012. Preparation of nanocrystalline cellulose via ultrasound and its reinforcement capability for poly (vinyl alcohol) composites. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19: 479-485.
- 18-Missoum, K., Martoia, F., Bwlgacem, M. N., & Bars, J. 2013. Effect of chemically modified nanofibrillated cellulose addition on the properties of fiber-based materials. *Industrial Crops and Products*, 48: 98-105.
- 19-Morais, J. P. S., Rosa, M. d. F., Nascimento, L. D., do Nascimento, D. M., & Cassales, A. R. 2013. Extraction and characterization of nanocellulose structures from raw cotton linter. *Carbohydrate Polymers*, 91 (1): 229-235.
- 20-Nakamura, T., Takagi, H., & Shima, J. 2009. Effects of ice-seeding temperature and intracellular trehalose contents on survival of frozen *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Cryobiology*, 58 (2): 170-174.
- 21-Oksman, K., Mathew, A., Bondeson, D., & Kvien, I. 2006. Manufacturing process of cellulose whiskers/poly(lactic acid) nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 66 (15): 2776-2784.
- 22-Otero, M. C., Espeche, M. C., & Nader-Macías, M. E. 2007. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. *Process Biochemistry*, 42 (10): 1406-1411.
- 23-Palmfeldt, J., Rådström, P., & Hahn-Hägerdal, B. 2003. Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology*, 47 (1): 21-29.
- 24-Peng, B., Dhar, N., Liu, H., & Tam, K. 2011. Chemistry and applications of nanocrystalline cellulose and its derivatives: a nanotechnology perspective. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 89: 1191-1206.
- 25-Rushdy, A., & Gomaa, E. 2013. Antimicrobial compounds produced by probiotic *Lactobacillus brevis* isolated from dairy products. *Annals of Microbiology*, 63: 81-90.
- 26-Saarela, M., Virkajärvi, I., Nohynek, L., Vaari, A., & Mäntö, J. 2006. Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 112 (2): 171-178.
- 27-Schoug, Å., Olsson, J., Carlfors, J., Schnürer, J., & Håkansson, S. 2006. Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3 effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. *Cryobiology*, 53 (1): 119-127.
- 28-Schwab, C., Vogel, R., & Gänzle, M. G. 2007. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1. 106 during freeze-drying. *Cryobiology*, 55 (2): 108-114.
- 29-Sczostak, A. 2009. Cotton linters: an alternative cellulosic raw material. *Macromolecular symposia: Wiley Online Library*. 45-53.
- 30-Syverud, K., Kirsebom, H., Hajizadeh, S., & Chinga-Carrasco, G. 2011. Cross-linking cellulose nanofibrils for potential elastic cryo-structured gels. *Nanoscale research letters*, 6: 1-6.
- 31-Tymczynszyn, E. E., Sosa, N., Gerbino, E., Hugo, A., Gomez-Zavaglia, A., & Schebor, C. 2012. Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *International Journal of Food Microbiology*, 155 (3): 217-221.
- 32-Zayed, G., & Roos, Y. H. 2004. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry*, 39 (9): 1081-1086.

Designing and optimizing of cryoprotective culture based on nanocellulose to enhance the viability of *Lactobacillus Brevis* JN368471.1 during freeze drying

Fatemeh Keivani Nahr¹, Reza Rezaei Mokarram^{2*}, Amin Hejazi Mohammad³, Babak Ghanbarzadeh⁴, Mahmoud Sowti², Khaled Zoroufchi Benis⁵

1- PhD Student, Department of Food Sciences and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author (rmokarram@tabrizu.ac.ir)

3- Associated Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute, Tabriz, Iran

4- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

5- MSc. Student, Agricultural Biotechnology Research Institute, Tabriz, Iran

Abstract

Freeze drying in particular is the preferred method for transporting and storing vast culture collections of micro-organism strain types. The main disadvantage of this method is cell damage induced through freezing. The usage of cryoprotectants due to the formation of glassy state would decrease cell damages through this stage. In this study, optimization of freezing media containing protective agents of nanocellulose, skim milk and trehalose was done using statistical design of response surface methodology (Central Composite Design). To determine the size of nanocellulose particles produced from cotton linter, atomic force microscopy and scanning electron microscopy were used. Nanocellulose particles had a width of less than 50 nm and length of hundreds of nanometers to several micrometers. Indigenous *Lactobacillus brevis* isolated from traditional dairy products were selected as target cells. By solving the regression equation, and analyzing the response surface plots, the optimal concentrations of the agents to maximize cell viability were determined as: Nanocellulose 13.75%, trehalose 20.5% and skim milk 13.75%. It seems that nanocellulose can be adsorbed on the surface of micro-organisms and form a viscous layer, preventing the growth of ice crystals by increasing the viscosity of the solution, and also keeps glass structure of ice near the cells. The results showed that RSM could effectively assess the main and interaction effects of protective factors on cell viability.

Keywords: Cryoprotectant, Freeze drying, *Lactobacillus brevis*, Nanocellulose