



## انکپسولاسیون همزمان باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) و روغن غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ به روش کواسرواسیون مرکب

ویدا مردانی قهفرخی<sup>۱</sup>، اصغر خسروشاهی اصل<sup>۱</sup>، شهین زمردی<sup>۲\*</sup>

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲. بخش تحقیقات فنی و مهندسی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران.

### چکیده

### اطلاعات مقاله

انکپسولاسیون همزمان باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 و روغن ماهی به عنوان روغن غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ با استفاده از ایزوله پروتئین سویا (SPI) و صمغ عربی (GA) به عنوان مواد دیواره و به روش کواسرواسیون مرکب مورد بررسی قرار گرفت. کواسرویت‌های مایع به دو روش خشک کردن پاششی و انجمادی خشک شدند. شرایط بهینه کواسرواسیون از نظر غلظت کل بیوپلیمرها، pH و نسبت پروتئین به صمغ با اندازه‌گیری پتانسیل زتا، کدورت و بازده کواسرواسیون تعیین گردید. شرایط بهینه برای تشکیل کواسرویت‌ها با بیشترین بازده، استفاده از مخلوط بیوپلیمرها با غلظت ۲٪ (w/v)، نسبت ایزوله پروتئین سویا: صمغ ۴۰:۶۰ و pH=۴ به دست آمد. بازده کواسرواسیون در این شرایط ۷۵/۱-۲۲/۷۹٪ بود. زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در میکروکپسول‌های خشک شده به روش انجمادی به طور معنی‌داری ( $p<0.05$ ) بیشتر از میکروکپسول‌های خشک شده به روش پاششی بود. حضور همزمان روغن غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ همراه با باکتری پروبیوتیک در میکروکپسول‌ها به طور معنی‌داری ( $p<0.05$ ) موجب افزایش زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس طی فرایند انکپسولاسیون، شرایط اسیدی مشابه معده و روده گردید. متوسط اندازه میکروکپسول‌های مایع حاصل از مخلوط ایزوله پروتئین سویا: صمغ با و بدون روغن غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ به صورت همزمان به ترتیب  $19.0\text{ }\mu\text{m}$  و  $14.0\text{ }\mu\text{m}$  بود.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۳۰

کلمات کلیدی:

میکروانکپسولاسیون،

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5)،

روغن غنی از اسیدهای چرب امگا-۳،

ایزوله پروتئین سویا،

صمغ عربی.

DOI: 10.52547/fsct.18.120.199

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.120.16.8

\* مسئول مکاتبات:

s.zomorodi@areeo.ac.ir

## ۱- مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که پس از مصرف توسط انسان یا حیوان می‌توانند با بهبود ویژگی‌های فلور میکروبی روده مزبان موجب ایجاد اثرات سلامت‌بخش شوند. پیشگیری از ابتلا به سرطان و جهش‌های ژنتیکی، تقویت سیستم ایمنی، سنتز ویتامین و تقویت دستگاه گوارش از اثرات سلامت بخش باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشند. بهترین اثر سلامت بخش مصرف باکتری‌های پروبیوتیک زمانی حاصل می‌گردد که پروبیوتیک‌ها در پرزهای روده تکثیر شوند؛ زیرا در این صورت قادرند بر سیستم ایمنی روده موثر واقع شوند و همچنین ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد جهش‌زایی تولید کنند. از این‌رو زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در غلظتی بالاتر از  $10^6$  واحد کلنی بر گرم در فرآورده‌های غذایی تا زمان مصرف، مقاومت باکتری‌ها در برابر شرایط اسیدی معده و همچنین نمک‌های صفراوی روده پیش‌نیازی برای دستیابی به فواید متعدد یاد شده برای آن‌ها می‌باشد [۱]. لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس یکی از مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین گونه‌های پروبیوتیک به حساب می‌آید. این گونه، جزئی از فلور طبیعی روده کوچک انسان و حیوان است و در روده کوچک در حضور کشش سطحی پایین ایجاد شده توسط نمک‌های صفراوی به خوبی رشد می‌کند [۲]. یکی از تکنیک‌های رایج جهت بهبود قابلیت رشد و بقای پروبیوتیک‌ها در شرایط تولید و نگهداری فرآورده‌های غذایی و همچنین دستگاه گوارش میکروانکپسولاسیون می‌باشد. این روش، با به دام انداختن سلول‌های میکروبی در ساختار میکروکپسول‌ها پتانسیل بالایی در محافظت از میکروارگانیسم‌ها در برابر شرایط محیطی دارد [۱].

کواسرواسیون مرکب<sup>۱</sup> یکی از روش‌های متداول در انکپسولاسیون ترکیبات فعال و باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد. فرایند کواسرواسیون نوعی فرایند تفکیک فاز مایع-مایع بر مبنای انحلال پلی‌الکترولیت‌ها است که طی آن یک محلول آبی به یک فاز غنی از پلیمر (فاز توده‌ای یا کواسرویت) و یک فاز رقیق پلیمری (فاز تعادلی) تفکیک می‌گردد. در این فرایند به دنبال انتقال و برهم‌کنش مولکول‌های پلیمری، لایه‌ای اطراف ماده‌ای که بایستی ریزپوشانی شود (هسته) تشکیل شده که متعاقباً جامد می‌شود و به این ترتیب پوشش‌دهی کامل می‌گردد. کواسرواسیون مرکب با

ایجاد برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک بین ماکرومولکول‌هایی با بار الکتریکی (عمدتاً پروتئین و پلی‌ساکارید) مخالف آغاز می‌شود که فرایند برهم‌کنش پلیمر-پلیمر نیز نامیده می‌شود. پس از آن کمپلکس‌های محلول جهت کاهش میزان انرژی آزاد سیستم تجمع یافته و به حالت نامحلول در می‌آیند که این امر موجب تفکیک فاز مایع-مایع و تشکیل کواسرویت‌ها می‌گردد [۳]. غلظت پلیمرها، نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید، pH، قدرت یونی (غلظت نمک)، درجه حرارت، فشار و سرعت برشی به عنوان عوامل بیرونی و وزن مولکولی پروتئین و پلی‌ساکارید، انعطاف‌پذیری مولکول‌ها، دانسیته بار الکتریکی به عنوان عوامل درونی موثر بر فرایند کواسرواسیون به حساب می‌آیند [۴].

گزارشات گوناگونی مبنی بر ثمربخشی ریزپوشانی به روش کواسرواسیون در افزایش قابلیت بقای پروبیوتیک‌ها وجود دارد. سان و همکاران (۲۰۱۴) از روش کواسرواسیون با استفاده از ایزوله پروتئین سویا و پکتین با درجه متیلاسیون بالا برای انکپسوله کردن باکتری لاکتوباسیلوس پلاتناروم استفاده کردند و نشان دادند که قابلیت زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در شرایط شبیه‌سازی روده ۳ سیکل لگاریتمی بیشتر از باکتری پروبیوتیک در حالت آزاد بود [۵]. سیلوا و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که انکپسولاسیون باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس به روش کواسرواسیون و با استفاده از ژلاتین و صمغ عربی به عنوان مواد تشکیل دهنده دیواره موجب افزایش زنده‌مانی باکتری در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده گردید. علاوه بر این زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک طی دوره نگهداری در سه دمای ۱۸-، ۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با باکتری آزاد افزایش یافت. این پژوهشگران کارایی این روش را در انکپسوله کردن باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس قبل و بعد از خشک کردن میکروکپسول‌ها به روش خشک کردن انجمادی به ترتیب ۵۳/۸۷ و ۶۷/۷ درصد گزارش کردند [۶].

هدف از این تحقیق، میکروانکپسولاسیون باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس به تنهایی و همچنین به صورت همزمان با روغن ماهی به عنوان روغن غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ به روش کواسرواسیون مرکب با استفاده از ایزوله پروتئین سویا و صمغ عربی و بررسی اثر آن بر زنده‌مانی این باکتری در شرایط مشابه معده و روده می‌باشد.

1. complex coacervation

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد مورد استفاده

صمغ عربی، ایزوله پروتئین سویا، اسید کلریدریک، هیدروکسید سدیم، نمک صفراوی و آب پیتون از شرکت مرک آلمان، محیط کشت MRS براث و MRS بایل آگار از شرکت ایبرسکو تهیه شد. روغن ماهی به عنوان روغن غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ از طرف شرکت داروسازی دانا (تبریز) اهدا گردید. باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس La-5 نیز به صورت خشک‌شده انجمادی از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

### ۲-۲- کواسرواسیون ایزوله پروتئین سویا و صمغ

#### عربی

ابتدا بر اساس غلظت مورد نظر، پودر ایزوله پروتئین سویا و صمغ عربی به صورت مجزا در آب مقطر حل و به مدت ۳۰ دقیقه توسط هم‌زن مغناطیسی به هم زده شد. جهت اطمینان از آگیری کامل بیوپلیمرها، سوسپانسیون پروتئینی و محلول صمغ تهیه شده به مدت یک شب در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. سوسپانسیون ایزوله پروتئین سویا قبل از استفاده به مدت ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسوند قرار گرفت. سپس نسبت‌های مختلف پروتئین به صمغ (۳۰:۷۰، ۴۰:۶۰، ۵۰:۵۰، ۶۰:۴۰ و ۷۰:۳۰)، تهیه و بیوپلیمرها به مدت ۱۰ دقیقه توسط هم‌زن مغناطیسی مخلوط شدند. جهت کاهش pH دیسپرسیون (۲-۶) از اسید کلریدریک ۵/۰ مولار استفاده شد. برای اطمینان از انجام کامل واکنش الکترواستاتیکی بین دو پلیمر و تکمیل فرایند کواسرواسیون دیسپرسیون‌ها به مدت یک شب در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. برای تعیین pH بهینه از داده‌های حاصل از آزمون‌های پتانسیل زتا، کدورتسنجی و بازده کواسرواسیون در محدوده pH ۲-۶ استفاده شد. برای تعیین کدورت و بازده کواسرواسیون نسبت ۴۰:۶۰ پروتئین به صمغ تهیه شد.

### ۲-۳- پتانسیل زتا

ابتدا با استفاده از تغییرات پتانسیل زتای هر کدام از نمونه‌های خالص پروتئین و صمغ در غلظت ثابت ۱/۰ درصد (وزنی/حجمی) در مقابل تغییرات pH (از ۵/۶ تا ۳) محدوده pH بهینه برای انجام فرایند کواسرواسیون مشخص شد. برای تعیین بار الکتریکی سطحی ذرات که به پتانسیل زتا ( $\zeta$ ) موسوم

است از دستگاه زتاسایزر (مدل Nano ZS، انگلستان) استفاده شد. نتیجه آزمون در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  به دست آمد [۷].

### ۲-۴- اندازه‌گیری کدورت

برای تعیین دقیق‌تر pH بهینه، میزان جذب نسبت ۶۰ به ۴۰ مخلوط پروتئین و صمغ در سه غلظت ثابت ۵/۰، ۱ و ۲ درصد (وزنی/حجمی) در طول موج ۷۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Novaspec II، انگلیس) اندازه‌گیری شد [۸].

### ۲-۵- تعیین نسبت مناسب پروتئین به صمغ

برای تعیین نسبت بهینه پروتئین به صمغ (SPI:GA) میزان جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر تعیین شد. برای این منظور غلظت ۱ و ۲ درصد نسبت‌های مختلفی از پروتئین به صمغ (۳۰:۷۰، ۴۰:۶۰، ۵۰:۵۰، ۶۰:۴۰ و ۷۰:۳۰) تهیه شد. سپس pH محلول بر روی ۴ (pH بهینه) تنظیم شد. محلول به صورت مداوم با سرعت ۷۰۰ rpm توسط هم‌زن مغناطیسی هم زده شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه جذب محلول در طول موج ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

### ۲-۶- بازده کواسرواسیون

برای این منظور ابتدا سوسپانسیونی با دو سطح غلظت ۱ و ۲ درصد از نسبت ۴۰:۶۰ پروتئین به صمغ تهیه شد. سپس pH سوسپانسیون‌ها توسط اسید کلریدریک ۱/۰ مولار بین ۵/۶ تا ۳ تنظیم و به مدت ۵ ساعت در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد. کواسرویت‌ها توسط سانتریفوژ با سرعت ۴۰۰۰ rpm به مدت ۸ دقیقه از فاز آبی جدا شدند و سپس داخل آون با دمای  $60^{\circ}\text{C}$  تا رسیدن به وزن ثابت خشک شدند. سپس بازده کواسرویت تعیین گردید [۹].

### ۲-۷- فعال‌سازی باکتری لاکتوباسیلوس

#### اسیدوفیلوس La-5 و تهیه میکروکپسول‌ها

ابتدا محتوی بسته باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس La-5 در شرایط استریل به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط MRS-براث اضافه و ۲۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  گرمخانه‌گذاری شد تا باکتری وارد فاز لگاریتمی رشد شود. سپس مقدار بیشتری محیط MRS-براث اضافه و در همین شرایط کشت داده شد. کشت فعال شده تا زمان مصرف در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد [۱۰]. برای انجام فرایند انکپسولاسیون، ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت فعال شده به ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS-براث استریل اضافه و به مدت ۱۸

## ۲-۸- تعیین زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس

### اسیدوفیلوس در شرایط مشابه معده و روده

محلول شرایط مشابه معده با استفاده از ۰/۸ مولار اسید کلریدریک، ۲ درصد سود،  $\text{pH}=5/1$ ، بدون حضور پپسین تهیه شد. محلول شبیه شیر روده نیز با استفاده از محلول ۰/۰۵ مولار  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ،  $\text{pH}=2/7$  و ۶/۰ درصد نمک صفراوی تهیه شد و توسط میکروفلتر ۲/۰ میکرومتر استریل گردید [۱۱].

برای بررسی زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در شرایط معده، یک گرم از کپسول حاوی باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر شیر شبیه‌سازی شده معده پراکنده و برای مدت زمان‌های ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در دمای  $37^\circ\text{C}$  گرمخانه‌گذاری شد.

برای بررسی زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در شرایط روده نیز یک گرم از میکروکپسول‌ها ابتدا در ۱۰ میلی‌لیتر محلول شبیه شیر معده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $37^\circ\text{C}$  گرمخانه‌گذاری شد. سپس با محلول سود خنثی و در ۱۰ میلی‌لیتر محلول شبیه شیر روده به مدت ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در دمای  $37^\circ\text{C}$  گرمخانه‌گذاری شدند.

پس از گذشت زمان لازم، کپسول‌ها جداسازی و بوسیله محلول ۱/۰ درصد پیتون و اتر شسته داده شد. سپس باکتری‌های آزاد و انکپسوله شده شمارش گردید.

برای شمارش باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس، مقدار یک گرم از میکروکپسول‌های ریزپوشانی شده (مایع و جامد) و آزاد به ۹ میلی‌لیتر پیتون و اتر استریل ۱/۰ درصد اضافه شد. جهت رهاسازی هرچه بهتر باکتری‌های ریزپوشانی شده، سوسپانسیون میکروبی به مدت ۲ دقیقه توسط دستگاه ورتکس (FM9، ایران) هم زده شد. پس از تهیه رقت، در محیط MRS-آگار کشت داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  در انکوباتور گرمخانه‌گذاری و تعداد کلنی‌ها در هر رقت شمارش شد.

## ۲-۹- تعیین اندازه ذرات، شاخص پراکندگی

### ۱) (PDI) و پتانسیل زتا میکروکپسول‌ها

اندازه ذرات، شاخص چند بس پاشیدگی و پتانسیل زتا میکروکپسول‌های مایع با استفاده از دستگاه تفرق پویا<sup>۱</sup> (مدل Nano ZS، انگلستان) اندازه‌گیری شد.

ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  گرمخانه‌گذاری شد. باکتری پروبیوتیک توسط سانتریفوژ با سرعت  $4200\text{ rpm}$  به مدت ۱۰ دقیقه از محیط کشت جدا شده و دو بار با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد.

برای تهیه میکروکپسول‌ها، باکتری پروبیوتیک به ۲۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی ۲ درصد ایزوله پروتئین سویا اضافه شد و مدت ۱۰ دقیقه توسط همزن مغناطیسی با سرعت  $700\text{ rpm}$  به هم زده شد. سپس ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول ۲ درصد صمغ عربی در حال همزدن به سوسپانسیون اضافه گردید. جهت انجام فرایند کواکراسیون از اسید کلریدریک ۰/۵ مولار و تا رسیدن به  $\text{pH}=4$  استفاده شد. مخلوط حاصل به مدت ۸ ساعت در دمای  $4^\circ\text{C}$  نگهداری شد. ذرات کواکراسیت توسط سانتریفوژ با سرعت  $4000\text{ rpm}$  به مدت ۱۰ دقیقه از فاز آبی جدا شد. خشک کردن میکروکپسول‌ها به دو روش انجمادی (مدل دستگاه Siemens، آلمان) و پاششی (مدل دستگاه: مهام صنعت، ایران) انجام شد. در فرایند خشک کردن پاششی، دمای هوای ورودی  $150 \pm 1^\circ\text{C}$ ، دبی هوای ورودی،  $278 \pm 2\text{ m}^3/\text{h}$  و دبی خوراک  $1/2\text{ L/h}$  تعیین شد. دمای هوای خروجی در این شرایط  $64 \pm 1^\circ\text{C}$  به دست آمد. در روش خشک کردن انجمادی، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $-20^\circ\text{C}$  قرار گرفتند. پس از آن در دستگاه خشک‌کن انجمادیه مدت ۲۴ ساعت در دمای  $-80^\circ\text{C}$  در فشار  $0.2/0\text{ mbar}$  خشک شدند.

برای تهیه میکروکپسول‌های حاوی روغن غنی از اسیدهای چرب امگا-۳، ابتدا ۵ گرم روغن ماهی به ۲۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون ۲ درصد ایزوله پروتئین سویا اضافه گردید. به منظور تهیه امولسیون از هموژنایزر اولتراتوراکس ( $8000\text{ rpm}$ ، ۲ دقیقه) استفاده شد. باکتری پروبیوتیک به آرامی به امولسیون در حین هم زدن مداوم با همزن مغناطیسی اضافه شد. سپس ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول ۲ درصد صمغ عربی به عنوان فاز آبی ثانویه ( $W_2$ ) به امولسیون  $O/W_1$  اضافه شد تا یک امولسیون مرکب روغن در-آب در-آب ( $O/W_1/W_2$ ) تشکیل شود که در آن غلظت کل پلیمرها ۲ درصد، نسبت پروتئین به صمغ ۶۰ به ۴۰ و نسبت مواد هسته به دیواره ۱ به ۲ باشد. سپس به روش ذکر شده در فوق، میکروکپسول‌ها تهیه شدند. میکروکپسول‌ها درون ظروف شیشه‌ای درب‌دار استریل در دمای محیط ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) به مدت ۶۰ روز نگهداری شدند. شمارش باکتری‌های انکپسوله شده در روزهای ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ انجام شد.

1. Polydispersity  
2. Dynamic light Scattering

## ۲-۱۱- آنالیز داده‌ها

نتایج این طرح در قالب طرح کامل تصادفی تجزیه و تحلیل شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد. نمودارها با نرم افزار EXCEL رسم شد.

## ۳- بحث و نتایج

## ۳-۱- بهینه‌سازی کواسرواسیون بین ایزوله

## پروتئین سویا و صمغ عربی

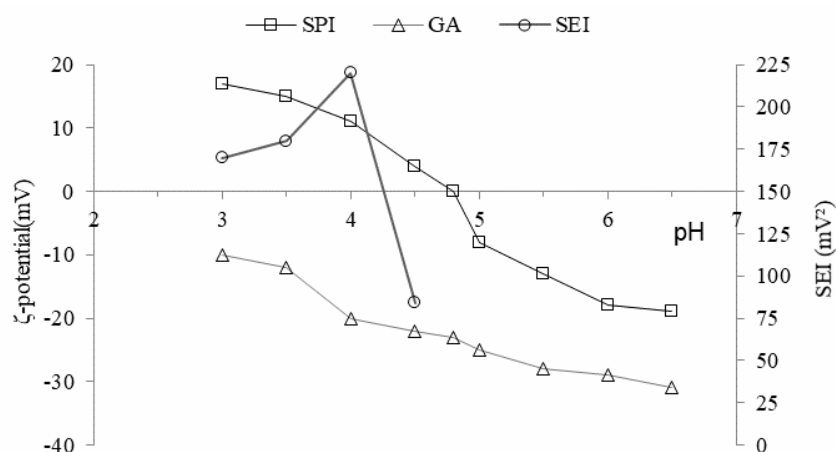
pH، قدرت یونی و نسبت پروتئین به صمغ می‌تواند میزان بار الکتریکی گروه‌های عاملی موجود در سطح بیوپلیمرها و شدت برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک بین آن‌ها را تحت تاثیر قرار دهد. از این‌رو کنترل این پارامترها جهت ایجاد شرایط بهینه به منظور برقراری پیوند میان پروتئین و پلی‌ساکارید و دستیابی به حداکثر بازده کواسرواسیون از اهمیت زیادی برخوردار است. پژوهش‌ها حاکی از آن است که انجام فرایند کواسرواسیون بین پروتئین و پلی‌ساکارید و بازده تولید کواسرویت‌ها به نوع پلیمرها و ویژگی‌های ساختاری آن‌ها بستگی دارد. از این‌رو بررسی و تعیین شرایط بهینه جهت انجام این فرایند برای هر نوع دیسپرسیون پلیمری به صورت مجزا ضروری می‌باشد [۱۲]. تغییرات pH به میزان قابل توجهی موجب تغییر در میزان دانسیته بار الکتریکی آمفولیت‌ها و همچنین تغییر در ساختار پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها می‌گردد. از آنجا که برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک میان پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها مهم‌ترین نقش را در تشکیل کواسرویت‌ها دارد، لذا تغییرات pH می‌تواند فرایند کواسرواسیون را به میزان قابل توجهی تحت تاثیر قرار دهد [۳]. تغییرات پتانسیل زتای دیسپرسیون‌های ایزوله پروتئین سویا و صمغ عربی در محدوده pH ۳ تا ۵/۶ در شکل ۱ نشان داده شده است. بیشترین خاصیت آنیونی صمغ عربی در  $pH = 5/6$  با پتانسیل زتای  $mv -31$  مشاهده شد. با کاهش pH دیسپرسیون صمغ عربی پتانسیل زتای آن افزایش یافت و در  $pH = 3$  به  $mv -10$  رسید. صمغ عربی یک نوع صمغ آنیونی است که زتا پتانسیل آن در رنج گسترده‌ای از pH منفی می‌باشد. زیرا گروه کربوکسیل تنها گروه عاملی در ساختار این صمغ می‌باشد. در یک پژوهش مشخص شده است که با نزدیک شدن pH صمغ عربی

به  $pK_a$ ، پروتون‌های زیادی آزاد شده و این ترکیب به شدت دارای بار منفی می‌شود. از این‌رو در  $pH < 2/2$  صمغ عربی دارای بیشترین میزان بار الکتریکی منفی می‌باشد. با افزایش pH از ۳ به ۵/۶، زتا پتانسیل ایزوله پروتئین سویا از  $mv +17$  به  $mv -20$  کاهش یافت. در  $pH = 8/4$  که pH ایزوالکتریک ایزوله پروتئین سویا می‌باشد پتانسیل زتا برابر صفر بود. وابسته بودن پتانسیل زتای ایزوله پروتئین سویا به pH به دلیل خاصیت آمفوتریک پروتئین‌ها و حضور گروه‌های کربوکسیل ( $-COOH$ ) و آمین ( $-NH_2$ ) در ساختار پروتئین‌ها می‌باشد. در کمتر از pI، تعداد گروه‌های عاملی دارای بار الکتریکی مثبت ( $-NH_4^+$ ) بیشتر از تعداد گروه‌های عاملی دارای بار الکتریکی منفی ( $-COO^-$ ) می‌باشد که این امر منجر به ایجاد بار الکتریکی خالص مثبت در مولکول پروتئین می‌گردد. در حالیکه در pH-های بالاتر از نقطه ایزوالکتریک با افزایش تعداد گروه‌های عاملی با بار الکتریکی منفی، بار الکتریکی خالص پروتئین منفی می‌گردد [۱۳]. ایزوله پروتئین سویا در pHهای بالاتر از نقطه ایزوالکتریک (حدود  $8/4$ ) دارای بار منفی و خاصیت آنیونی و تنها در کمتر از pI دارای بار الکتریکی مثبت و خاصیت کاتیونی می‌باشد. از آنجا که تشکیل کمپلکس بین پروتئین با پلی‌ساکارید به طور عمده از طریق تعاملات الکترواستاتیک بین پلیمرها صورت می‌گیرد، از این‌رو کواسرواسیون میان ایزوله پروتئین سویا و صمغ عربی در محدوده  $pH 2/2 - 8/4$  و حداکثر میزان کواسرواسیون در  $pH_{opt}$  انجام می‌گیرد. برای تعیین pH بهینه توسط پتانسیل زتا استحکام برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی<sup>۱</sup> (SEI) میان پلیمرها طی فرایند کواسرواسیون حائز اهمیت می‌باشد زیرا خصوصیات فیزیکومکانیکی و همچنین ویژگی‌های حرارتی کواسرویت‌ها را به میزان قابل توجهی تحت تاثیر قرار می‌دهد [۹]. SEI، تعیین کننده pHی است که در آن بیشترین اختلاف پتانسیل الکتریکی بین پلیمرها وجود دارد و از قدر مطلق حاصل ضرب پتانسیل زتای دو پلیمر در محدوده‌ای از pH که پلیمرها دارای بار الکتریکی مخالف هستند به دست می‌آید. بیشترین مقدار SEI در  $pH_{opt}$  به دست می‌آید. در این نقطه تفکیک فاز سریع‌تر اتفاق می‌افتد و کواسرویت‌ها در پایدارترین حالت خود هستند. همانطوری که در شکل ۱ مشاهده می‌شود در pHهای کمتر از pH ایزوالکتریک، با کاهش pH از  $8/4$  به ۴

1. Strength of electrostatic interaction

وینبرک و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که بیشترین SEI برای صمغ عربی و ایزوله پروتئین آب پنیر در pH برابر ۴ به دست آمد و در این نقطه تفکیک فازها سریعتر اتفاق می‌افتد و اندازه کواسرویت‌ها هم درشت‌تر است [۱۳].

مقدار SEI افزایش و پس از آن با کاهش بیشتر pH مقدار SEI به میزان قابل توجهی کاهش یافت. حداکثر SEI در pH=۴ به دست آمد. در واقع با افزایش یا کاهش بیشتر pH نسبت به pH<sub>opt</sub> از شدت کواسرواسیون میان پلیمرها کاسته می‌شود.



**Fig 1** Effect of pH on zeta potential (mv) and strength of electrostatic interaction (SEI) of soy protein isolate (SPI) and gum arabic (GA)

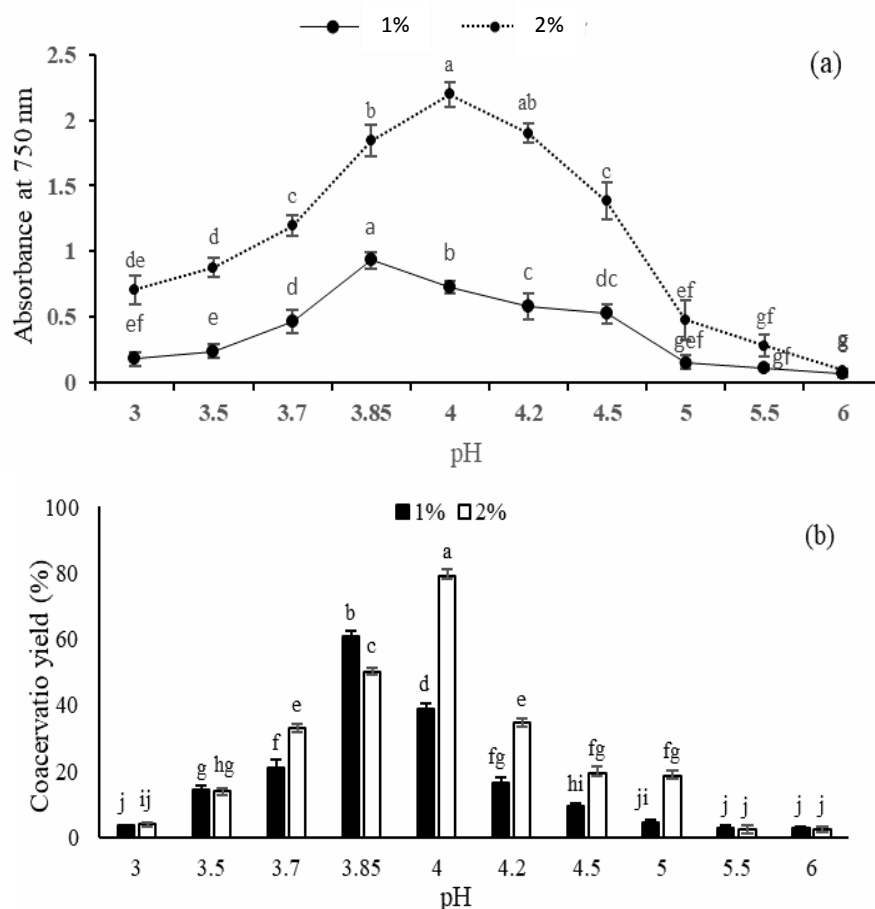
مورد دیسپرسیون با غلظت کل ۲ درصد، با کاهش pH تا نقطه ۴ کدورت دیسپرسیون افزایش یافت. پس از آن کاهش بیشتر pH منجر به کاهش کدورت دیسپرسیون گردید. بیشترین کدورت برای دیسپرسیون با غلظت کل ۱ درصد در pH برابر با ۸۵/۳ مشاهده شد. حضور تعداد و اندازه بیشتر ذرات در دیسپرسیون-های پلیمری دلیل بالاتر بودن میزان کدورت دیسپرسیون می‌باشد [۴]. متناسب با تغییرات کدورت، بازده کواسرواسیون با کاهش pH تا نقطه ۴ افزایش می‌یابد و به حداکثر مقدار خود می‌رسد. با کاهش بیشتر pH بازده کواسرواسیون کاهش یافت. بازده کواسرواسیون دیسپرسیون با غلظت ۱ درصد به صورت معنی-داری ( $p < 0.05$ ) از دیسپرسیون با غلظت ۲ درصد پایین‌تر بود. ژوئن-شیا و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که فرایند کواسرواسیون میان ایزوله پروتئین سویا و صمغ عربی از طریق اندازه‌گیری میزان جذب کمترین میزان جذب سوپرناتانت و بیشترین بازده کواسرواسیون در pH ۴ مشاهده شد [۱۶].

### ۲-۳- تعیین pH بهینه توسط اندازه‌گیری

#### کدورت و بازده کواسرواسیون

مطالعات حاکی از آن است که شرایط بهینه از نظر pH و همچنین نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید را می‌توان از طریق اندازه‌گیری کدورت و ویسکوزیته تعیین نمود [۱۴]. با برقراری حداکثر برهم‌کنش میان پلیمرهایی با بار الکتریکی مخالف، بیشترین مقدار کدورت در سوسپانسیون و در نتیجه بیشترین بازده تولید کواسرویت‌ها مشاهده خواهد شد. از طرف دیگر پس از انجام فرایند کواسرواسیون در شرایط بهینه و جداسازی کواسرویت‌ها توسط سانتریفوز، سوپرناتانت کم‌ترین میزان کدورت را دارد [۱۵].

با توجه به شکل ۲ پروفایل کدورت-pH به غلظت وابسته است. با افزایش غلظت نمودارهای کدورت به مقادیر بالاتری انتقال یافت. جذب دیسپرسیون با غلظت کل ۲ درصد در طول موج ۷۵۰ نانومتر در مقایسه با سطح غلظت کل ۱ درصد بالاتر بود. در



**Fig 2** The effect of pH on a) absorbance at 750 nm and b) coacervation yield (%) for SPI-GA dispersion (ratio 60:40) at different biopolymers and pH values. Different lowercase letters indicate a significant difference at the level of  $P < 0.05$  between different treatments.

پروتئین نسبت به صمغ عربی باعث کاهش میزان کدورت گردید. در غلظت‌های ۱ و ۲ درصد با افزایش غلظت کل،  $pH_{opt}$  به سمت مقادیر بالاتری جابجا شد. در واقع در نسبت مشخصی از پروتئین به پلی‌ساکارید که نسبت بهینه جهت انجام فرایند کواسرواسیون می‌باشد، بیشترین تعداد گروه‌های کربوکسیل پلی‌ساکارید توسط گروه‌های آمین پروتئین خنثی می‌شوند و در نتیجه حداکثر برهم‌کنش الکترواستاتیک بین پلیمرها و تشکیل کمپلکس‌های نامحلول (کواسرویت) حاصل می‌گردد. با تغییر این نسبت و افزایش غلظت هر کدام از پلیمرها، میزان بارهای الکتریکی خنثی نشده در ساختار پلیمرها افزایش می‌یابد. این امر با تشدید نیروی دافعه الکترواستاتیک بین پلیمرها، تشکیل

### ۳-۳- تعیین نسبت بهینه ایزوله پروتئین سویا به

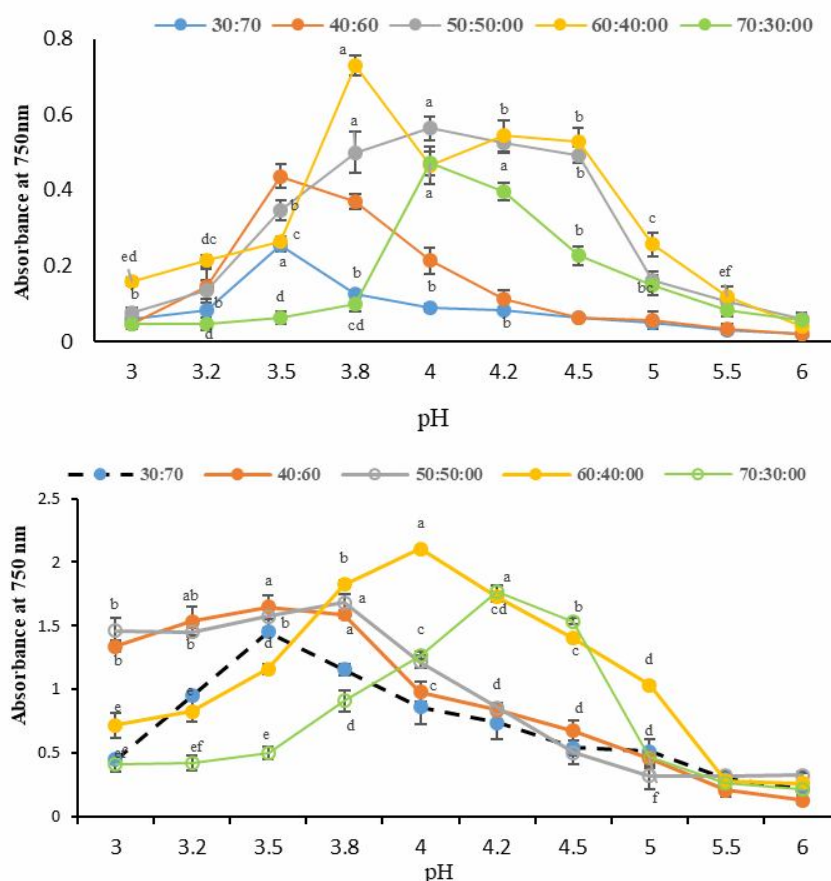
### صمغ عربی توسط اندازه‌گیری کدورت و بازده

#### کواسرواسیون

$pH$  و نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید از مهم‌ترین فاکتورهای موثر در فرایند کواسرواسیون هستند که می‌توانند با تاثیر روی تعادل بار بین پروتئین و پلی‌ساکارید شدت برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک بین آن‌ها را تحت تاثیر قرار دهند [۴]. همانطوری‌که از شکل ۳، مشاهده می‌شود در هر دو غلظت کل ۱ و ۲ درصد، با افزایش نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید تا یک نسبت خاصی کدورت افزایش یافت. پس از آن، افزایش بیشتر سهم

داشته باشد. از این رو تعیین مقدار کمپلکس‌های نامحلول تشکیل شده طی فرایند کواسرواسیون از طریق اندازه‌گیری بازده کواسرواسیون می‌تواند روشی موثر در تعیین نسبت بهینه پروتئین به پلی‌ساکارید به حساب آید [۸].

کمپلکس‌های محلول را افزایش، میزان کدورت و بازده کواسرواسیون را کاهش می‌دهد [۱۷]. نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید با تأثیر بر تعادل بار الکتریکی میان پلیمرها و شدت برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک بین آن‌ها می‌تواند نقش مهمی در میزان تشکیل کمپلکس‌های نامحلول طی فرایند کواسرواسیون

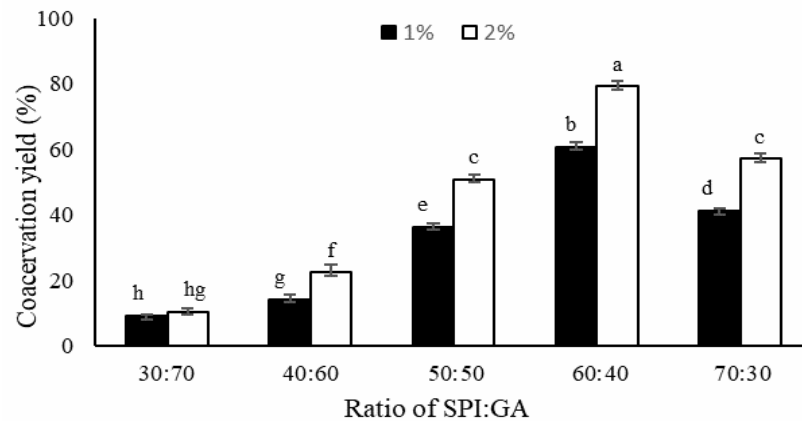


**Fig 3** The pH-turbidity curves for SPI-GA containing a) 1% and b) 2%. Different lowercase letters indicate a significant difference at the level of  $P < 0.05$  for each ratio between different pH.

محلول در دیسپرسیون باشد. در واقع در نسبت‌های کمتر و یا بیشتر از نسبت بهینه، با به هم خوردن تعادل بار الکتریکی بین پلیمرها و شدت برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک کاهش و احتمال تشکیل کمپلکس‌های محلول در مقایسه با کمپلکس‌های نامحلول افزایش می‌یابد. این امر منجر به کاهش بازده کواسرواسیون می‌گردد [۱۸].

با توجه به شکل ۴، در هر دو غلظت، با افزایش نسبت پروتئین به صمغ از ۷۰:۳۰ تا ۴۰:۶۰ بازده کواسرواسیون به صورت معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) افزایش یافت. بیشترین بازده کواسرواسیون برابر با  $2.79 \pm 0.75/1$  درصد، در نسبت ۴۰:۶۰ پروتئین به صمغ برای دیسپرسیون با غلظت کل ۲ درصد به دست آمد. پس از آن با افزایش نسبت پروتئین به صمغ بازده کواسرواسیون کاهش یافت که دلیل آن می‌تواند مربوط به افزایش مقدار کمپلکس‌های





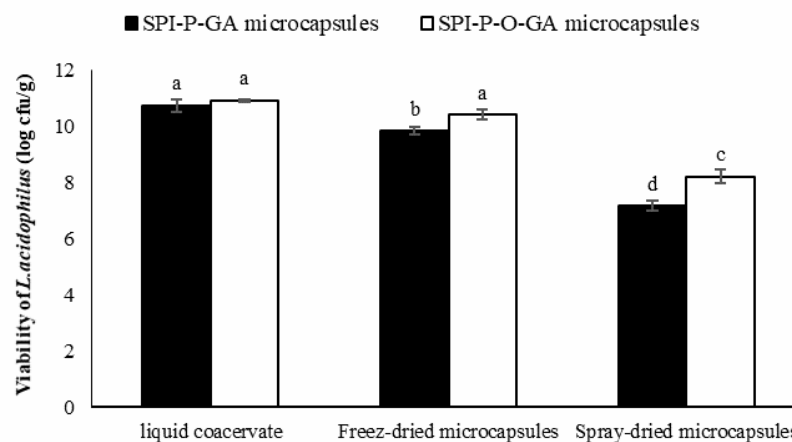
**Fig 4** Coacervation yield of different ratios of SPI:GA at pH=4 and at biopolymer concentration a)1% and b)2% (w/v). Different lowercase letters indicate a significant difference at the level of  $P<0.05$  between different treatments.

محافظت‌کنندگی روغن بر باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس باشد. تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس زنده در هر دو نوع میکروکپسول‌های خشک شده به روش انجمادی به طور معنی‌داری ( $p<0.05$ ) بالاتر از میکروکپسول‌های خشک شده به روش پاششی بود. دلیل این امر می‌تواند مربوط به استفاده از دمای بالا طی فرایند خشک کردن، مواجهه باکتری با استرس حرارتی و آب‌زدایی ناگهانی طی فرایند خشک کردن پاششی باشد [۱۹]. نتایج مشابهی نیز توسط آرات و همکاران (۲۰۱۴) گزارش شده است. این پژوهشگران اظهار داشتند که ترکیبات لیپیدی موجب می‌گردد تا باکتری در معرض تنش کمتری ناشی از شرایط محیطی قرار گیرد [۱۹].

### ۳-۴- تأثیر روش‌های تیمارها بر زنده‌مانی

#### لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

با توجه به شکل ۵، تعداد باکتری‌ها در کواسریت‌های حاوی باکتری و کواسریت‌های حاوی باکتری و روغن غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ به ترتیب  $74/10 \pm 21/0$  و  $91/10 \pm 6/0$  لگاریتم واحد کلنی بر گرم بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ( $p<0.05$ ) باهم نداشتند. وجود روغن غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ در میکروکپسول‌ها به طور معنی‌داری ( $p<0.05$ ) موجب افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در هر دو روش خشک کردن گردید که دلیل آن می‌تواند مربوط به اثر



**Fig 5** Viability of *L. acidophilus* (log cfu/g) in liquid coacervates and dried microcapsules. Different lowercase letters indicate a significant difference at the level of  $P<0.05$  between different samples.

با توجه به جدول ۱، حضور همزمان روغن در میکروکپسول‌ها زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک را طی دوره نگهداری ۶۰ روزه در دمای محیط به طور معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) افزایش داد. بیشترین زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک مربوط به میکروکپسول‌های حاوی باکتری پروبیوتیک و روغن غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ به صورت همزمان و خشک شده به روش انجمادی بود.

از بین رفتن باکتری‌های پروبیوتیک و کاهش فعالیت سلولی نه تنها طی فرایند انکپسولاسیون می‌تواند اتفاق بیفتد، بلکه در طول نگهداری باکتری انکپسوله شده نیز می‌توان شاهد این تغییر بود. زمانی که باکتری پروبیوتیک تحت فرایند خشک کردن پاششی قرار می‌گیرد، بسیاری از فعالیت‌های بیولوژیکی سلول‌های

میکروبی پس از چند هفته نگهداری در دمای محیط متوقف می‌گردد. که دلیل این امر تغییرات ناشی از اعمال حرارت و فرایند خشک کردن در غشای میکروارگانیسم‌ها و ترکیبات پروتئینی سلول‌ها از جمله آنزیم‌ها می‌باشد. در واقع غشای سیتوپلاسمی حساس‌ترین بخش به این فرایند است و افزایش نفوذپذیری آن می‌تواند سبب نشت ترکیبات داخل سلولی به محیط در طول دوره نگهداری شود [۱]. در این راستا، دسموند و همکاران (۲۰۰۲) نیز یکی از معایب فرایند خشک کردن پاششی طی انکپسوله کردن باکتری‌های پروبیوتیک را پایین بودن زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک بعد از فرایند خشک کردن و همچنین در طول دوره نگهداری عنوان کردند [۲۰].

**Table 1** Effect of treatments on the viability of *L.acidophilus* (log cfu/g) during storage at  $25 \pm 1^\circ \text{C}$

Treatments	Time (day)				
	0	15	30	45	60
FD-SPI-P-GA	$83.77 \pm 0.5^{\text{Bab}}$	$84.98 \pm 0.46^{\text{Ba}}$	$83.62 \pm 0.68^{\text{Bab}}$	$81.96 \pm 0.96^{\text{Bb}}$	$80.05 \pm 0.29^{\text{Bc}}$
FD-SPI-P-O-GA	$89.28 \pm 1.48^{\text{Aa}}$	$88.58 \pm 2.03^{\text{Aa}}$	$88.54 \pm 0.24^{\text{Aa}}$	$85.34 \pm 0.18^{\text{Aa}}$	$85.13 \pm 0.29^{\text{Aa}}$
SD-SPI-P-GA	$61.44 \pm 1.67^{\text{Aa}}$	$57.28 \pm 0.8^{\text{Db}}$	$52.47 \pm 1.57^{\text{Dc}}$	$49.8 \pm 0.9^{\text{Dc}}$	$43.91 \pm 1.57^{\text{Dd}}$
SD-SPI-P-O-GA	$70.85 \pm 2.06^{\text{Ca}}$	$70.35 \pm 1.58^{\text{Ca}}$	$68.9 \pm 0.72^{\text{Cab}}$	$67.96 \pm 0.32^{\text{Cb}}$	$64.9 \pm 0.78^{\text{Cc}}$

Values shown indicate mean of three independent readings  $\pm$  SD. Different lowercase letters indicate a significant difference at the level of  $P < 0.5$  between different treatments. Different uppercase letters indicate a significant difference at the level of  $P < 0.5$  between different storage times. FD-SPI-P-GA: Freeze-dried microcapsules contained probiotic bacteria, SD-SPI-P-GA: Spray-dried microcapsules contained probiotic bacteria, FD-SPI-P-O-GA: Freeze-dried microcapsules contained probiotic bacteria and oil, SD-SPI-P-O-GA: Spray-dried microcapsules contained probiotic bacteria and oil.

### ۳-۵- زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس

#### اسیدوفیلوس در شرایط مشابه معده و روده

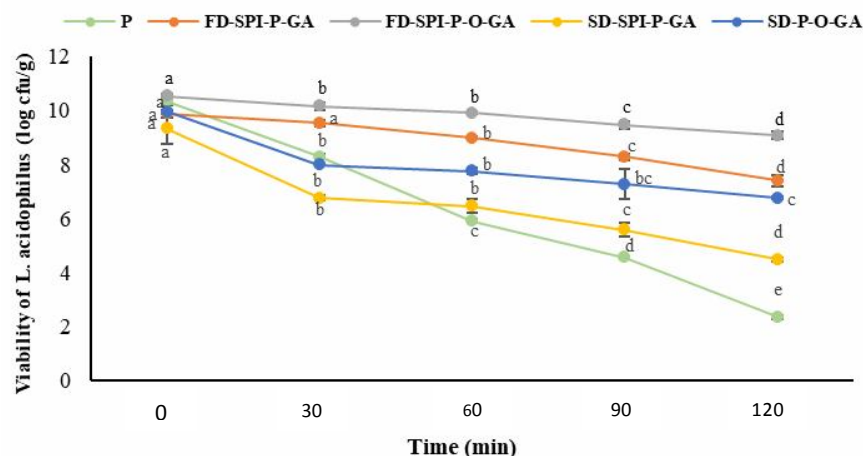
همان‌طوری که در شکل ۶ مشخص است، تفاوت قابل توجهی بین زنده‌مانی باکتری در سه حالت مذکور وجود داشت. با شمارش میکروبی در زمان‌های ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه مشخص شد که جمعیت باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در حالت آزاد در شرایط اسیدی مشابه معده با گذشت زمان به سرعت و به اندازه  $9.7 \pm 2.5/0$  سیکل لگاریتمی کاهش یافت. این میزان کاهش در میکروکپسول‌های حاوی باکتری پروبیوتیک و خشک شده به روش انجمادی و پاششی به ترتیب  $4.7/2 \pm 2.6/0$  و  $8.5/4 \pm 5.5/0$  سیکل لگاریتمی بود. در واقع فرایند انکپسولاسیون مقاومت باکتری پروبیوتیک را در این شرایط به طور معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) افزایش داد. انکپسولاسیون همزمان باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس با روغن غنی از اسیدهای چرب

سیلوا و همکاران (۲۰۱۷) نیز نشان دادند که پس از انکپسولاسیون همزمان لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و روغن آفتابگردان با استفاده از آلژینات، تعداد باکتری‌های زنده در میکروکپسول‌ها بعد از ۶۰ روز نگهداری در دمای  $25^\circ \text{C}$  تنها به اندازه ۱ سیکل لگاریتمی کاهش پیدا کرد. میکروکپسول‌های حاوی باکتری پروبیوتیک و روغن به صورت همزمان پایداری بیشتری در طول دوره نگهداری و شرایط اسیدی داشتند که دلیل آن وجود مقادیر قابل توجهی توکوفرول به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی و نقش آن در محافظت از باکتری‌های پروبیوتیک بیان شد [۶]. همچنین یون‌های  $\text{H}^+$  و اکسیژن به میزان محدودتری می‌توانند در کپسول‌هایی بر پایه ترکیبات لیپیدی انتشار یابند و به همین دلیل این نوع میکروکپسول‌ها می‌توانند اثر محافظت‌کنندگی بیشتری بر باکتری‌های پروبیوتیک در برابر عوامل و شرایط محیطی داشته باشند [۲۱].

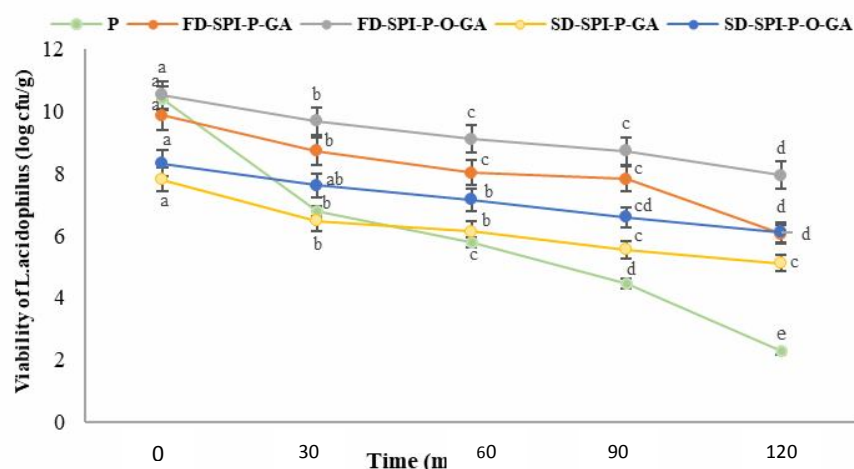
کواسرویت‌ها در محیط‌های اسیدی دچار تغییر شده و موجب قرار گرفتن بخشی از میکروارگانیسم‌های انکپسوله شده در معرض شرایط اسیدی مشابه با شرایط معده می‌شود و این امر می‌تواند دلیلی در کاهش تعداد باکتری‌های انکپسوله شده در این شرایط باشد [۲۳].

با توجه به شکل ۷، انکپسولاسیون باکتری پروبیوتیک به روش کواسرواسیون و با استفاده از ایزوله پروتئین سویا و صمغ عربی به عنوان مواد دیواره به طور معنی‌داری موجب افزایش زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک‌ها در شرایط روده گردید ( $p < 0.05$ ). کم‌ترین و بیشترین میزان زنده‌مانی به ترتیب مربوط به باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در حالت آزاد و باکتری انکپسوله شده همراه با روغن غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ و خشک شده به روش انجمادی بود. انکپسولاسیون همزمان باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس با روغن غنی از اسیدهای چرب امگا-۳-تأثیر معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) در افزایش قابلیت زنده‌مانی باکتری در شرایط مشابه روده داشت. تشکیل لایه هیدروژل در اطراف باکتری‌ها طی فرایند انکپسولاسیون می‌تواند قرار گرفتن سلول‌های میکروبی در معرض شیره معده و روده را به تاخیر بیندازد و به این ترتیب موجب افزایش قابلیت زیستی باکتری گردد [۱].

امگا-۳-تأثیر معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) در افزایش قابلیت زنده‌مانی باکتری در شرایط مشابه معده داشت. علاوه بر این، روش خشک کردن تأثیر مهمی در میزان زنده‌مانی و مقاومت باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در شرایطی اسیدی داشت. بیشترین زنده‌مانی مربوط به میکروکپسول‌های حاوی باکتری پروبیوتیک و روغن غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ و خشک شده به روش انجمادی بود. در این شرایط تعداد باکتری‌ها پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه تنها  $4.1 \pm 2.1 \times 10^4$  سیکل لگاریتمی کاهش یافت. در حالی‌که میزان کاهش تعداد باکتری‌ها در میکروکپسول‌های حاوی باکتری پروبیوتیک و روغن غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ و خشک شده با خشک‌کن پاششی  $1.9 \pm 0.5 \times 10^5$  سیکل لگاریتمی بود. نتایج مشابهی نیز در سایر پژوهش‌ها گزارش شده است. بوسنیا و همکاران (۲۰۱۴)، نیز نشان دادند که تعداد باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازنی و لاکتوباسیلوس پلانتروم انکپسوله شده در کواسرویت‌های متشکل از ایزوله پروتئین آب پنیر و صمغ عربی در شرایط مشابه معده و روده به ترتیب ۵/۲ و ۵ سیکل لگاریتمی کاهش یافت [۲۲]. از آنجایی که باکتری‌های پروبیوتیک انکپسوله شده به روش کواسرواسیون توسط گروه‌های اسیدی و بازی موجود در ساختار بیوپلیمرها احاطه شده‌اند که این گروه‌ها با اتصال به یون‌های  $H^+$  موجب کاهش اثرات نامطلوب این یون‌ها بر باکتری‌های پروبیوتیک می‌شود. اما ممکن است ساختار



**Fig 6** Viability of encapsulated and free *L. acidophilus* (log cfu/g) during exposure to simulated gastric juice. Different lowercase letters indicate a significant difference at the level of  $P < 0.05$  between different treatments. P: free *L. acidophilus*, FD-SPI-P-GA: Freeze-dried microcapsules contained probiotic bacteria, SD-SPI-P-GA: Spray-dried microcapsules contained probiotic bacteria, FD-SPI-P-O-GA: Freeze-dried microcapsules contained probiotic bacteria and oil, SD-SPI-P-O-GA: Spray-dried microcapsules contained probiotic bacteria and oil.



**Fig 7** Viability of encapsulated and free *L. acidophilus* (log cfu/g) during exposure to simulated intestinal juice. Different lowercase letters indicate a significant difference at the level of  $P < 0.05$  between different times for each sample. P: free *L. acidophilus*, FD-SPI-P-GA: Freeze-dried microcapsules contained probiotic bacteria, SD-SPI-P-GA: Spray-dried microcapsules contained probiotic bacteria, FD-SPI-P-O-GA: Freeze-dried microcapsules contained probiotic bacteria and oil, SD-SPI-P-O-GA: Spray-dried microcapsules contained probiotic bacteria and oil.

حاوی باکتری و میکروکپسول‌های حاوی باکتری و روغن به صورت همزمان به ترتیب  $52/4 \pm 14/0$  و  $19/1 \pm 19/0$   $\mu\text{m}$  دست آمد که نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین آنها است. پتانسیل زتا، اختلاف پتانسیل بین لایه یونی متحرک و لایه غیرمتحرک می‌باشد و بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطحی دیسپرسیون است. زیرا نشان‌دهنده میزان تجمع بار در لایه غیرمتحرک و شدت جذب یون‌های مخالف به سطح ذره است. اختلاف معنی‌داری بین پتانسیل زتا کواسروات‌های مایع SPI-P-GA و SPI-P-O-GA وجود نداشت.

کیم و همکاران (۲۰۰۸)، اظهار داشتند که انکپسولاسیون روش موثری برای افزایش باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در برابر نمک‌های صغراوی است [۲۴].

### ۳-۶- اندازه ذرات، زتاپتانسیل و شاخص

#### پراکندگی (PDI) کواسروات‌های مایع تولیدی

همانطوری که از جدول ۲ مشخص است حضور روغن به همراه باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در میکروکپسول‌ها به طور معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) موجب افزایش اندازه ذرات میکروکپسول‌ها گردید. میانگین اندازه ذرات میکروکپسول‌های

**Table 2** Particle size ( $\mu\text{m}$ ), polydispersity (PDI) and zeta potential (mv) of liquid microcapsules

Treatments	Particle size ( $\mu\text{m}$ )	Polydispersity (PDI)	Zeta potential (mv)
SPI-P-GA	$0.19^b \pm 1.19$	$0.82 \pm 0.01^a$	$-10.12 \pm 0.3^a$
SPI-P-O-GA	$0.14^a \pm 4.52$	$0.83 \pm 0.02^a$	$0.74^a \pm 10.63$

Values show indicate mean of three independent readings  $\pm$  SD. Different lowercase letters in each column indicate a significant difference at the level of  $P < 0.05$  between different treatments. SPI-P-GA: Microcapsules contained *L. acidophilus*. SPI-P-O-GA: Co-microcapsules contained *L. acidophilus* and oil.

دسته از میکروکپسول‌ها احتمالاً به این خاطر است که در روش کواسرواسیون، کواسرویت‌های تشکیل شده معمولاً از آگلومره شدن تعدادی کواسرویت تک هسته بوجود می‌آیند [۲۵]. پینگ و همکاران (۲۰۱۴)، با انجام تحقیقی در زمینه انکپسولاسیون روغن خردل به روش کواسرواسیون، اندازه ذرات میکروکپسول‌ها را بین  $1-15$   $\mu\text{m}$  گزارش کردند [۲۶].

ویسکوزیته و رفتار جریان سوسپانسیون حاوی بیوپلیمرها، غلظت بیوپلیمرها، دما، pH، وجود نمک در سوسپانسیون و سرعت برشی اعمال شده طی فرایند انکپسولاسیون از عوامل تاثیرگذار بر اندازه میکروکپسول‌های تولید شده می‌باشد. آپریلیا و همکاران (۲۰۱۷)، اظهار داشتند که نوع ماده تشکیل‌دهنده هسته نیز می‌تواند بر اندازه میکروکپسول‌ها موثر باشد. بزرگتر بودن این

between b-lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. Food Hydrocolloids. 13, 483-496.

- [5] Sun, Q., Wang, F., Han, D., Zhao, Y., Liu, Z., Lei, H., Song, Y., Huang, X., Li, X., Ma, A., Yuan, G., Li, X. and Yang, Z. 2014. Preparation and optimization of soy protein isolate-high methoxy pectin microcapsules loaded with *Lactobacillus delbrueckii*. International Journal of Food Science and Technology. 49, 1287-1293.
- [6] Silva, T. M. D., Barin, J. S., Lopes, E. J., Cichoski, A. J., Flores, E. M. D. M., Silva, C. D. B. D. and Menezes, C. R. D. M. 2019. Development, characterization and viability study of probiotic microcapsules produced by complex coacervation followed by freeze-drying. Food Technology. 49, 1-7.
- [7] Espinosa-Andrews, H., Enriquez-Ramirez, K. E., García-Márquez, E., Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C. and Vernon-Carter, J. 2013. Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes. Carbohydrate Polymers. 95(1), 161-166.
- [8] Eratte, D., Wang, B., Dowling, K., Barrow, C. J and Adhikari, B. P. 2014. Complex coacervation with whey protein isolate and gum arabic for the microencapsulation of omega-3 rich tuna oil. Food and Function. 5, 2743-2750.
- [9] Huang, G-Q., Sun, Y-T., Xiao, J-X. and Yang, J. 2012. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. Food Chemistry. 135, 534-539.
- [10] Zomorodi, SH., khosrowshahi asl, A., Razavi rohani, S. M. and Miraghaei, S. 2011. Survival of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* and their effect on composition of Iranian white cheese produced by ultrafiltration technique. International Journal of Dairy Technology. 64 (1): 84-91.
- [11] Rao, A. V., Shiwnarain, N. and Maharaj, I. 1989. Survival of microencapsulated *bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal. 22(4), 345-349.
- [12] Chang, P. G., Gupta, R., Timilsena, Y. P. and Adhikari, B. 2016. Optimisation of the

## ۴- نتیجه گیری

بررسی فرایند کواسرواسیون مرکب ایزوله پروتئین سویا و صمغ عربی با روش‌های اندازه‌گیری زتا پتانسیل، کدورت سنجی و بازده کواسرواسیون نشان داد که عواملی از قبیل غلظت کل بیوپلیمرها، نسبت پروتئین به صمغ و pH در بازده کواسرواسیون موثر بود. با توجه به نتایج این بررسی شرایط بهینه برای تشکیل کواسرویت‌ها با بیشترین بازده، مقدار ۲ درصد مخلوط بیوپلیمرهای ایزوله پروتئین سویا و صمغ عربی به نسبت ۶۰:۴۰ و pH=۴ بود. انکپسولاسیون باکتری لاکتوباسیلوس/سیدوفیلوس (La-5) با این روش بطور معنی‌داری موجب افزایش زنده‌مانی باکتری طی دوره نگهداری ۶۰ روزه و شرایط مشابه معده و روده گردید. علاوه بر این، حضور هم‌زمان روغن غنی از اسیدهای چرب امگا۳- توانست زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس/سیدوفیلوس را به طور قابل توجهی در مواجهه با شرایط محیطی افزایش دهد. در واقع روش کواسرواسیون هم‌زمان باکتری پروبیوتیک و روغن غنی از اسیدهای چرب امگا۳- با استفاده از ایزوله پروتئین سویا و صمغ عربی پتانسیل خوبی در انکپسولاسیون باکتری پروبیوتیک جهت محافظت از آن در برابر شرایط محیطی نشان داد. بنابراین، این روش می‌تواند در صنایع غذایی و دارویی جهت تولید فراورده‌های پروبیوتیک مورد توجه قرار گیرد.

## ۵- منابع

- [1] Anal, A. K. and Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Food Science and Technology. 18, 240-251.
- [2] Kailasapathy, K. and Chin, J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Immunology and Cell Biology. 78, 80-88.
- [3] Turgeon, S. L., Schmitt, C. and Sanchez, C. 2007. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 12, 166-178.
- [4] Schmitt, C., Sanchez, F., Thomas, F. and Hardy, J. 1999. Complex coacervation

- coacervates: Turbidity and rheology. Food Hydrocolloids. 64, 18-27.
- [21] Silva, M. P., Tulini, F. L., Martins, E., Penning, M., Fávaro-Trindade, C. S. and Poncelet, D. 2018. Comparison of extrusion and co-extrusion encapsulation techniques to protect *Lactobacillus acidophilus* LA3 in simulated gastrointestinal fluids. LWT - Food Science and Technology. 89, 392–399.
- [22] Picot, A. and Lacroix, C. 2004. Encapsulation of Bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Dairy Journal. 14(6), 505-515.
- [23] Bosnea, L. A. and Moschakis, T. 2014. Complex coacervation as a novel microencapsulation technique to improve viability of probiotics under different stresses. Food Bioprocess Technol. 2767–2781.
- [24] Kim, S. S. Y., Cho S. H., Kim O. S. and II-Shik, S. 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. LWT-Food Science and Technology. 3, 493-500.
- [25] Aprilia, V., Murdiati, A., Hastuti, P. and Harmayani, E. 2017. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 in hydrogel using a complex coacervation of glucomannan and chitosan. Research Journal of Microbiology. 4, 236-242.
- [26] Peng, C., Zhao, S. Q., Zhang, J., Huang, G.Y., Chen, L.Y. and Zhao, F. Y. 2014. Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation. Food Chemistry. 168, 560-568.
- complex coacervation between canola protein isolate and chitosan. Journal of Food Engineering. 191, 58-66.
- [13] Weinbreck, F., Tromp, R. and De Kruif, C. 2004. Composition and structure of whey protein/gum arabic coacervates. Biomacromolecules. 5(4), 1437-1445.
- [14] Amatayakul, T., Sherkat, F. and Shah, N. P. 2006. Syneresis in set yogurt as affected by EPS starter cultures and levels of solids. International Journal of Dairy Technology. 59, 216-221.
- [15] Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B. and Maji, T. 2017. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates. Advances in Colloid and Interface Science. 239, 136-145.
- [16] Jun-Xia, X., Hai-Jan, Y. and Jian, Y. 2011. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soy protein isolate/gum Arabic. Food Chemistry. 125, 1267-1272.
- [17] Chang, C. P., Leung, T. K., Lin, S. M. and Hsu, C. C. 2006. Release properties on gelatingum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene. Colloids and Surfaces. B Biointerfaces. 50, 136-140.
- [18] Dong, D., Qi, Z., Hua, Y., Chen, Y., Kong, X. and Zhang, C. 2015. Microencapsulation of flaxseed oil by soya proteins–gum arabic complex coacervation. International Journal of Food Science and Technology. 50, 1785–1791.
- [19] Desmond, C., Ross, R.P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G. and Stanton, C. 2002. Improved survival f *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. Journal of Applied Microbiology. 93, 1003-1011.
- [20] Liu, J., Shim, Y. Y., Shen, J. and Wang, Y. 2017. Whey protein isolate and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) gum electrostatic



## Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* (La-5) and omega-3 rich oil through complex coacervation

Mardani Ghahfarokhi, V.<sup>1</sup>, Khosroshahi Asl, A.<sup>1</sup>, Zomorodi, Sh.<sup>2\*</sup>

1. Department of Food Science and Technology, Urmia University, Urmia, Iran.

2. Department of Engineering Research, West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Urmia, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><b>Article History:</b></p> <p>Received 2021/07/20 Accepted 2021/09/21</p> <hr/> <p><b>Keywords:</b></p> <p>Microencapsulation, <i>Lactobacillus acidophilus</i>, Omega-3 rich oil, Arabic gum, Soy protein isolate.</p> <hr/> <p><b>DOI:</b> 10.52547/fsct.18.120.199 <b>DOR:</b> 20.1001.1.20088787.1400.18.120.16.8</p> <hr/> <p>*Corresponding Author E-Mail: s.zomorodi@areeo.ac.ir</p>	<p>Co-encapsulation of <i>Lactobacillus acidophilus</i> and Tuna oil rich in omega-3 fatty acids using Soy protein isolate (SPI) and Arabic gum (GA) as wall materials was studied through the complex coacervation method. The microcapsules were dried separately by freeze and spray drying. The optimal conditions for the coacervation between soybean protein isolate and gum Arabic as functions of pH, SPI/GA ratio and total concentration of biopolymers were investigated using zeta potential, turbidity, and coacervation yield assays. The highest coacervate yield was achieved in the total concentration of biopolymers 2% (w/v), SPI/GA ratio 60:40 and pH=4, and the highest coacervation yield was 79.22±1.75%. <i>Lactobacillus acidophilus</i> (La-5) viability was significantly (<math>p&lt;0.05</math>) higher in freeze-dried microcapsules in comparison with spray-dried microcapsules. Omega-3 fatty oil improved significantly (<math>p&lt;0.05</math>) the viability of probiotic bacteria during 60 days storage in ambient temperature and gastrointestinal conditions. The size of <i>L. acidophilus</i> containing microcapsules and co-microcapsules (SPI-P-O-GA) were 1.19±0.19 and 4.42±0.14 <math>\mu\text{m}</math>, respectively.</p>