



درون پوشانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC 1643 با دیواره کامپوزیتی صمغ زانتان، ایزوله پروتئین

سویا و فروکتوالیگوساکارید: بررسی ویژگی‌های میکروکپسول‌ها

مریم عباسی گزنی^۱، محمود رضازاد باری^۲، محمد علیزاده خالد آباد^۳، صابر امیری^{۴*}

۱- دانشجوی دکترای تخصصی زیست فناوری مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

درون پوشانی روشی موثر برای افزایش زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد. هدف از این پژوهش تعیین فرمولاسیون بهینه برای میکروکپسولاسیون لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC 1643 با ایزوله پروتئین سویا، صمغ زانتان و فروکتوالیگوساکارید به عنوان مواد دیواره با روش خشک کردن انجمادی می‌باشد. بدین منظور ۱۹ تیمار با طرح **Combine** توسط نرم افزار **Design expert** تهیه شدند. آزمون‌های کارایی درون پوشانی، اندازه ذرات، پتانسیل زتا، و زنده مانی پروبیوتیک، **FTIR** و **SEM** بر روی نمونه‌ها انجام شد. نمونه بهینه بر اساس کمترین پتانسیل زتا و اندازه ذرات انتخاب گردید و ویژگی‌های میکروکپسول، با آزمون‌های فوق‌الذکر تعیین گردید. نتایج نشان داد زنده مانی پروبیوتیک با افزایش غلظت ایزوله پروتئین سویا و صمغ زانتان به ترتیب افزایش و کاهش یافت. اندازه ذرات نمونه‌ها نیز با افزایش غلظت ایزوله پروتئین سویا افزایش یافت. به طور کلی با توجه به اثر محافظتی صمغ زانتان، ایزوله پروتئین سویا و فروکتوالیگوساکارید بر پروبیوتیک‌ها می‌توان نتیجه گرفت که این ترکیبات به عنوان دیواره برای درون پوشانی می‌توانند برای غنی سازی محصولات غذایی مورد استفاده قرار گیرند.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵

کلمات کلیدی:

ایزوله پروتئین سویا،

فروکتوالیگوساکارید،

درون پوشانی،

صمغ زانتان،

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC 1643

DOI: 10.22034/FSCT.19.133.115

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.24.9

* مسئول مکاتبات:

sa.amiri@urmia.ac.ir

۱- مقدمه

در دهه‌های اخیر، توسعه غذاهای عملگرا مانند محصولات پروبیوتیکی افزایش یافته است. پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده تعریف می‌شوند که می‌توانند تاثیر مثبتی بر میزبان در صورت استفاده کافی داشته باشند. پروبیوتیک‌ها فوایدی همچون حفظ میکرو فلور طبیعی روده، تقویت سیستم ایمنی و کاهش کلسترول خون دارند [۱، ۲]. رایج‌ترین پروبیوتیک‌های گنجانده شده در غذاهای عملگرا گونه‌های لاکتوباسیلوس هستند که به عنوان میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زا موجود در روده شناخته می‌شوند و نقش مهمی در جلوگیری از کلونی شدن پاتوژن‌ها و تنظیم پاسخ ایمنی میزبان دارند. لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس از طریق تولید اسیدهای آلی و باکتریوسین اثر ضد میکروبی نشان می‌دهد [۳]. لاکتوباسیلوس مقاوم به اسید صفاورابوده و اثر آنتی بیوتیکی روی پاتوژن‌های روده دارد [۴، ۵]. میکروکپسولاسیونیک از رایج‌ترین تکنیک‌هایی است که برای افزایش زنده ماندن پروبیوتیک‌ها استفاده می‌شود. انکپسولاسیونیک عامل فعال (مواد هسته) را در داخل ترکیبی دیگر (مواد دیواره) به دام می‌اندازد و ذرات در محدوده نانومتر یا میکرومتر تولید می‌کند. دیواره یا مواد پوششی مورد استفاده در روش‌های ریزپوشانی باید خوراکی، ایمن و زیست تخریب پذیر باشند. این ترکیبات می‌توانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، رزین‌ها و لیپیدها باشند [۶، ۷].

صمغ زانتان یک هتروپولی ساکارید است که از واحدهای D-گلوکز، D-مانوز و D-گلوکورونیک اسید تشکیل شدند. صمغ زانتان از تخمیر هوازی محیط کشت زانتاموناس کامپستریس خالص تولید می‌شود [۸]. این هیدروکلئید به دلیل عملکرد بالا به ویژه در محیط‌هایی مانند اسید، نمک زیاد و تنش برشی بالا به یکی از موفق‌ترین هیدروکلئیدها تبدیل شده است [۹].

در میان پروتئین‌های غذایی، ایزوله پروتئین سویا^۱ (SPI) یک پروتئین غذایی مهم با پتانسیل زیادی است که به دلیل طبیعت آبگریز سطحی، به عنوان حامل (نانو) عوامل زیستی نامحلول عمل می‌کند. SPI به دلیل خواص عملکردی، ماهیت غیر سمی،

هزینه کم، در دسترس بودن آسان و ارزش غذایی بالا در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۶]. همچنین این ترکیب به دلیل قابلیت امولسیون‌کنندگی و ژل‌کنندگی در بسیاری از محصولات غذایی مانند گوشت فرآوری شده، نوشیدنی‌های مغذی، شیرخشک نوزادان و جایگزین محصولات لبنی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۰]. اجزای پروتئینی اصلی در SPI، گلیسینین و β -کانگلاسینین هستند. گلیسینین از یک زیر واحد اسیدی و یک زیر واحد تشکیل شده است که توسط یک پل دی سولفیدی واحد متصل می‌شوند. β -کانگلاسینین نیز از سه زیر واحد α ، α' و β تشکیل شده است [۱۱].

فروکتوالیگوساکارید یک الیگومر فروکتوز است که به مولکول‌های گلوکز یا فروکتوز مرتبط است که حاوی حداکثر ده بخش قند است. فروکتوالیگوساکاریدها بسیار محلول در آب و جز کربوهیدرات‌های کم کالری است. سطوح دوز فروکتوالیگوساکارید در محدوده ۲ تا ۵۰ درصد (وزنی/وزنی) برای فرمولاسیون‌های مختلف غذایی توصیه می‌شود. فروکتوالیگوساکاریدها جز کربوهیدرات‌های زنجیره کوتاه بوده که در حال حاضر جز دسته پری بیوتیک‌ها هستند. این کربوهیدرات‌ها با خواص پری بیوتیک مقاومت بالایی به هضم و جذب توسط دستگاه گوارش نشان می‌دهند که سبب کاهش محتوای کالری می‌شوند [۱۲، ۱۳].

در سال‌های اخیر پژوهش‌های بسیاری در خصوص درون پوشانی پروبیوتیک‌ها توسط محققان مختلف انجام گرفته است که می‌توان به درون پوشانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با دیواره پروتئین پوسته برنج و مالتودکسترین [۱۴]، درون پوشانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با دیواره ایزوله پروتئین آب پنیر و لاکتوز [۱۵]، درون پوشانی لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس با دیواره آلزینات و ایزوله پروتئین آب پنیر [۱۶] و درون پوشانی لاکتوباسیلوس پلاتناروم با دیواره پروتئین سویا [۱۷] اشاره کرد.

هدف از این پژوهش، درون پوشانی باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس PTCC 1643 با دیواره کامپوزیتی صمغ زانتان، ایزوله پروتئین سویا (SPI) و فروکتو الیگوساکارید و تعیین نمونه بهینه بر اساس آزمون‌ها پتانسیل زتا، اندازه ذرات و کارایی درون پوشانی می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

صمغ زانتان (۱۱۱۳۸۶۶۲)، ایزوله پروتئین سویا (SPI) (S1674-500G) و فروکتوالیگوساکارید (MFCD00677049) از شرکت سیگما آلدریج، محیط کشت MRS(Man, Rogosa, Sharpe) آگار و MRS(Man, Rogosa, Sharpe) برات از شرکت مرک آلمان و اجزای تشکیل دهنده بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) (۰/۲ گرم KCl، ۱/۴۴ گرم Na_2HPO_4 ، ۰/۲۴ گرم KH_2PO_4 ، ۸ گرم NaCl ، pH=۷٫۲) و سایر مواد شیمیایی نیز از شرکت مرک آلمان بودند. سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس PTCC 1643 از کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران، خریداری شد.

تجهیزات مورد استفاده شامل Astell انگلیسی، انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد بهداد ایرانی، سانتریفیوژ یخچال دار، ترازو با دقت ۰/۰۰۱ گرم Sartorius، ورتکس Reax Control, Heidolph, Schwabach, Germany، دستگاه DLS (Model SZ-100, Horiba Ltd، کیوتو، ژاپن)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (JSM-840 SEM, Bruker, Karlsruhe, Tokyo, Japan) و اسپکتروفتومتر (Model Equinox 55 LS 101, Germany) مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۲- آماده سازی باکتری پروبیوتیک

برای تهیه تلقیح، ۰/۵ گرم از پودر خشک شده انجمادی سلول‌های *L. acidophilus* به ۵ میلی لیتر از MRS برات اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت، به صورت بی‌هوازی انکوبه شد. سپس محلول در ۹۵ میلی لیتر از MRS برات کشت شده و در همان شرایط رسیدن به \log_{10} CFU/ml از *L. acidophilus* به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. زیست توده با استفاده از سانتریفیوژ با دور $\times 4000$ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد برداشت شد. مایع رویی جدا شد و پس از شستن سلول‌ها و دو بار با محلول نمکی بدون بافر استریل سانتریفیوژ شدند. سپس، مجدداً، سوسپانسیون نمکی تهیه

شده و تا رسیدن به محلولی حاوی \log_{10} CFU/ml ۱۲ باکتری برای ریزپوشانی آماده شد. دانسیته نوری در ۶۲۵ نانومتر با استفاده از یک اسپکتروفتومتر (UV-1800PC, Shimadzu Corp، کیوتو، ژاپن) تعداد سلول‌ها را در \log_{10} Cfu/mL ۱۲ ارائه کرد. شمار میکروبی به صورت Cfu/mL اندازه گیری شد و میانگین داده‌های حاصله به \log_{10} cfu/mL تبدیل گردید [۱۸].

۲-۳- درون پوشانی باکتری پروبیوتیک

درون پوشانی باکتری مطابق روش Maleki و همکاران [۱۵] انجام شد. ابتدا مواد دیواره شامل SPI، صمغ زانتان و فروکتوالیگوساکارید با نسبت‌های مختلف در بافر فسفات استریل نمکی (PBS) پس از انحلال مطابق جدول (۱) مخلوط و آماده‌سازی شدند. به طوری که، غلظت محلول زانتان اولیه، قبل از اختلاط ۰/۲٪ (w/v) در بافر فسفات استریل نمکی (PBS) بود و غلظت SPI ۰/۵٪ (w/v) در بافر فسفات استریل نمکی (PBS) بوده و انحلال در pH ۱۰ انجام شد. محلول‌های اولیه تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت به منظور آبرسانی کامل در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس، اختلاط با نسبت‌های موجود در طرح جدول (۱) با استفاده از همزن مغناطیسی، انجام گردید. در ادامه، پودر فروکتوالیگوساکارید طبق درصد تعیین شده در جدول (۱) به مخلوط حاصله اضافه شده و با استفاده از همزن مغناطیسی، همزدن به مدت ۱۰ دقیقه انجام یافت.

در شرایط استریل، ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی (غلظت باکتریایی $10^9 \times 1/5$ v) تهیه شد. سپس به ۴۰ میلی لیتر از محلول صمغ، SPI و فروکتوالیگوساکارید، اضافه گردید و با همزن مغناطیسی به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط گردید. پس از طی این مرحله، ۲٪ توئین ۸۰ استریل و ۲٪ گلیسرول استریل، به سوسپانسیون حاصله افزوده شده و با همزن مغناطیسی به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط گردید. قبل از قرار دادن محلول آماده شده در خشک کن انجمادی، نمونه در فریزر ۳۰- درجه سانتی‌گراد، منجمد شد. سپس در شرایط خلاء، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد، وارد خشک کن انجمادی شد. فرآیند خشک نمودن انجمادی، ۴۸ ساعت به طول انجامید. میکروکپسول‌های خشک جمع آوری شده و در ظروف آلومینیومی استریل شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، نگهداری شدند.

۲-۴- کارایی درون پوشانی باکتری

برای تعیین کارایی ریزپوشانی، ابتدا ۱ گرم از پودر به ۱۰ میلی لیتر از تری سدیم-سیترات استریل ۲٪ وزنی/حجمی اضافه شد و با استفاده از میکسر (Vortex, Heidolph, Reax Control, Schwabach, Germany) به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شد. پس از سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰rpm در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، رقت‌های متوالی از مایع رویی تهیه و با استفاده از محیط کشت MRS آگار کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. میزان کارایی ریزپوشانی با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد [۱۹]:

$$EE\% = \left(\frac{N}{N_0} \right) \times 100$$

که در آن، N باکتری آزاد شده زنده و N_0 مقدار اولیه باکتری اضافه شده است.

۲-۵- زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

زنده مانی برای تعیین زنده ماندن باکتری پروبیوتیک در مدت زمان انقضا محصول و وارد شدن به بدن مصرف کننده و تبدیل شدن آن به فلور میکروبی مستقر روده می‌باشد که متجر به تقویت سیستم ایمنی فرد می‌شود. بدین منظور، رقت ۰/۱ گرم از *L. acidophilus* درون پوشانی شده تهیه گردید و در محیط کشت MRS آگار کشت شد و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۵ روز انکوبه شد و در نهایت تعداد باکتری‌ها $\text{Log}(\text{Cfu/g})$ شمارش شد [۱۵].

۲-۶- اندازه ذرات و پتانسیل زتا

اندازه ذرات نمونه‌های پودر با استفاده از دستگاه DLS با استفاده از یک آنالایزر نانوذره (Horiba Ltd, Model SZ-100)، کیوتو، ژاپن) با لیزر He-Ne در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد اندازه‌گیری شد. ۲ میلی لیتر از نمونه با استفاده از آب مقطر دوبار رقیق شد و اندازه گیری ها در زاویه پراکندگی ۱۷۳ درجه و طول موج ۶۳۳ نانومتر انجام شد. میانگین اندازه ذرات هیدرودینامیکی

(میانگین Z) بر اساس وزنی شدت با استفاده از معادله استوکس-انیشتین برای توزیع اندازه ذرات که در زیر آورده شده است. اندازه گیری پتانسیل زتا در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتیگراد با استفاده از سلول الکتروفورز مویرگی تا شده انجام شد. نتایج از نرم افزار با ابزار (هوریبا) به دست آمد [۲۰].

۲-۷- طیف سنجی FTIR

برای مطالعه ساختار شیمیایی میکروکپسول‌ها از آنالیز FT-IR استفاده شد. تجزیه و تحلیل FT-IR از 4000cm^{-1} تا 400cm^{-1} با وضوح 4cm^{-1} و سرعت اسکن 40s^{-1} ، با ۳۲ اسکن در نمونه، با استفاده از اسپکترومتر Bruker, Karlsruhe, Model Equinox 55 LS 101 (Germany) انجام شد. گلوله های KBr با نسبت نمونه به KBr (1:10 w/w) تهیه شدند [۲۱].

۲-۸- میکروسکوپ الکترونی روبشی

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) برای ارزیابی مورفولوژی سطح و خواص ریزساختاری پودر انکپسوله شده که با خشک کردن انجامی تولید شده‌اند، استفاده گردید. نمونه‌ها با یک لایه نازک طلای هادی پوشانده شده و سپس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (JSM-840 SEM, Tokyo, Japan) با ولتاژ ۲۰ کیلو ولت مورد بررسی قرار گرفتند [۲۲].

۳- طرح آزمایشی و آنالیز آماری

در این تحقیق از طرح combine برای ۱۹ تیمار مطابق جدول (۱) با استفاده از نرم افزار Design expert 12 استفاده شد. برای بررسی تاثیر متغیرها به دست آوردن مدل از تحلیل واریانس و رگرسیون استفاده شد. در این مطالعه، سطح خطای نوع اول $\alpha = 0/05$ بود. همچنین، برای رسم نمودارها و بررسی سایر آزمون‌ها از نرم افزار Excel 2016 و نرم افزار Minitab 20 استفاده گردید.

Table 1 The matrix of mixture design for microcapsules wall components

Run	Xanthan gum (%)	Soy protein isolate (%)	Fructooligosaccharide (%)
1	0	100	1
2	75	25	1.5
3	50	50	2
4	50	50	0
5	100	0	1
6	100	0	1
7	0	100	2
8	75	25	0.5
9	100	0	2
10	50	50	1
11	0	100	1
12	0	100	0
13	50	50	2
14	50	50	1
15	100	0	0
16	50	50	1
17	25	75	0.5
18	25	75	0
19	25	75	1.5

۴- نتایج و بحث

۴-۱- کارایی درون پوشانی

کارایی درون پوشانی میزان به دام افتادن *L. acidophilus* درون کپسول‌ها را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج آنالیز آماری، کارایی درون پوشانی باکتری *L. acidophilus* درون کپسول‌ها با تغییر درصد مواد دیواره به طور معناداری تغییر می‌یابد ($p < 0.05$). مطابق شکل (۱) با افزایش سطح صمغ زانتان و کاهش درصد SPI، میزان کارایی درون پوشانی افزایش یافت. به طوریکه در سطوح متوسط SPI و صمغ زانتان، بیشترین کارایی درون پوشانی مشاهده شد. همچنین با افزایش سطح فروکتوالیگوساکارید، کارایی انکپسولاسیون ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. به طور کلی بیشترین میزان کارایی در سطوح ۷۵٪ صمغ زانتان، ۲۵٪ SPI و ۱٪ فروکتوالیگوساکارید مشاهده شد. دلیل افزایش درون پوشانی به علت وجود پروتئین سویا، صمغ زانتان و فروکتوالیگوساکارید در ماتریس دیواره است که فوایدی همچون ایجاد پوششی محافظ روی دیواره سلولی باکتری و

جایگزینی بخشی از محل مولکول‌های آب در سلول‌ها را در طول فرایند خشک کردن فراهم می‌کند. این عمل به محافظت از تخریب غشای سلولی در طول فرایند خشک کردن انجام‌دهی کمک کرده و در نتیجه موجب افزایش کارایی درون پوشانی می‌گردد [۲۰]. بیشترین بازده زمانی است که SPI در غلظت متوسط باشد. این ممکن است به دلیل ایجاد یک لایه محافظ بهتر بر روی غشای سلولی باکتری باشد. افزایش غلظت SPI در سطوح بالا موجب ایجاد فشار اسمزی بیش از حد در محیط بین سلولی می‌گردد که در نتیجه آب سلول به بیرون نشت کرده و باعث پلاسمولیز و مرگ سلولی می‌شود و در نهایت کارایی درون پوشانی کاهش می‌یابد [۱۵]. نتایج مشابهی در خصوص افزایش کارایی درون پوشانی در سطوح متوسط ترکیبات دیواره توسط Maleki و همکاران [۱۵] برای میکروانکپسولاسیون لاکتوباسیلوس رامنوس با دیواره ایزوله پروتئین آب پنیر، اینولین و نانوسولز کریستالی و Yasmin و همکاران [۲۳] برای انکپسولاسیون بیفیدوباکتریوم لانگوم با دیواره ایزوله پروتئین آب پنیر، پکتین و آلژینات ارائه شد.

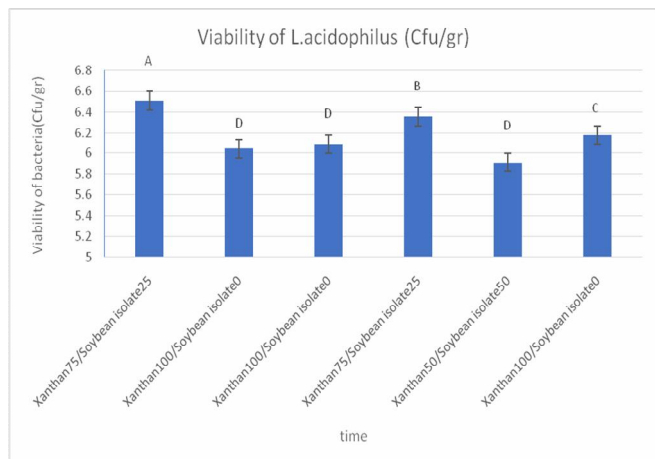


Fig 2 Viability of microencapsulated *L. acidophilus*

۴-۳- اندازه ذرات و پتانسیل زتا

بسیاری از خواص امولسیون‌ها به توزیع اندازه ذرات و قطر متوسط بستگی دارد. بنابراین شناخت اندازه ذرات امولسیون و کنترل و اندازه گیری اندازه ذرات در بررسی پایداری و کیفیت امولسیون‌ها ضروری می‌باشد. نتایج نشان داد که تغییر در غلظت مواد دیواره بر اندازه میکروکپسول‌ها تأثیر معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). با توجه به شکل (۳)، با افزایش درصد SPI، اندازه ذرات کپسول‌های تهیه شده افزایش یافت. این حالت می‌تواند به این دلیل باشد که با افزایش غلظت SPI، شانس کولاسیون بین گروه‌های هیدروفوبیک و سولفیدریل از یک گروه از پروتئینی به دیگر گروه‌های پروتئینی افزایش یابد [۱]. به طور کلی تفاوت در اندازه ذرات نمونه‌های مختلف با غلظت‌های مختلف مواد دیواره ممکن است مربوط به خواص متفاوت ژل شدگی و ایجاد محلول مواد مورد استفاده باشد [۲۰]. نتایج حاصل شده در هماهنگی با یافته‌های Maleki و همکاران [۱۵] بود.

پتانسیل زتا کپسول‌ها فاکتور مهم دیگر در پودرها برای ارزیابی پایداری کلوئیدها است. بالا بودن پتانسیل زتای ذرات کلوئیدی موجب بالا رفتن نیروی دافعه الکترواستاتیک و در نتیجه افزایش پایداری فیزیکی سیستم می‌شود. دامنه متعادل پتانسیل زتا بالای $+30\text{ mV}$ یا زیر -30 mV در نظر گرفته می‌شود [۲۵]. مطابق نتایج حاصله، مقدار پتانسیل زتا برای نمونه‌های مختلف کمتر از -30 mV می‌باشد که بیانگر تعادل کلوئیدال مناسب میکروکپسول‌های تولیدی است که این پایداری در جلوگیری از انباشته شدن مهم می‌باشد [۲۶]. همچنین بر اساس نتایج، با افزایش غلظت SPI، پتانسیل زتا نمونه‌ها کاهش یافت (جدول ۲).

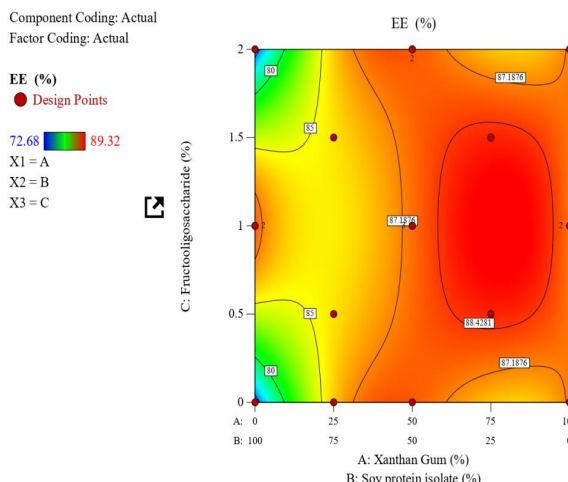


Fig 1 Encapsulation efficiency of microencapsulated *L. acidophilus*

۴-۲- زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

زنده مانی باکتری *L. acidophilus* در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۵ روز ارزیابی شد. شکل (۲) زنده مانی باکتری *L. acidophilus* انکپسوله شده را نشان می‌دهد. همانطور که ملاحظه می‌گردد، افزایش غلظت SPI موجب افزایش زنده مانی باکتری انکپسوله گردید. در نمونه حاوی صمغ زانتان و فاقد ایزوله پروتئین سویا زنده مانی باکتری در کمترین میزان بود. با این وجود، صمغ زانتان به علت خاصیت هم افزایی با پروتئین سویا تأثیر مثبتی بر زنده مانی باکتری داشت که به دلیل انحلال پایین ایزوله سویا و رسوب آن در نسبت‌های تهیه شده با زانتان بود. در نتیجه انکپسولاسیون *L. acidophilus* با SPI، صمغ زانتان و فروکتوالیگوساکارید منجر به بهبود قابل توجهی در زنده مانی باکتری کپسوله شده گردید. این یافته‌ها در راستای نتایج گزارش شده توسط Huq و همکاران [۲۴] برای انکپسولاسیون لاکتوباسیلوس رامنوس با آلژینات، سلولز نانوکریستال و لیستین و Maleki و همکاران [۱۵] برای میکروکپسولاسیون لاکتوباسیلوس رامنوس با ایزوله پروتئین آب پنیر، اینولین و نانوسلولز کریستالی بود.

همچون SPI و فروکتوالیگوساکارید موجب ایجاد اثر سینرژستیک و افزایش پتانسیل زتا گردید.

۴-۴- طیف سنجی FTIR

اسپکترسکوپی FTIR برای ارزیابی برهمکنش بین ترکیبات نمونه مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۷]. FTIR نمونه ایزوله پروتئین سویا، صمغ زانتان و نمونه انکپسوله شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با دیواره صمغ زانتان، SPI و فروکتوالیگوساکارید در شکل (۴) آورده شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود، الگوی جذب FTIR نمونه در محدوده 500 cm^{-1} تا 4000 cm^{-1} نشان داده شد. در طیف سنجی مربوط به SPI در شکل ۴-۴ پیک شاخصی در 3417 cm^{-1} مشاهده می‌شود که مربوط به گروه‌های OH و N-H روی رشته‌های پروتئینی سویا است [۷]. پیک شاخص در 2931 cm^{-1} مرتبط با پیوند کششی C-H و پیک در 1649 cm^{-1} احتمالاً به علت ساختار نوع اول آمید (ارتعاشات C=O) می‌باشد که مهمترین طیف در شناسایی ساختار ثانویه پروتئین است [۱۹]. پیک جذبی دیگر در 1530 cm^{-1} ناشی از وجود گروه‌های N-H مربوط به آمید نوع دوم می‌باشد. پیک قابل مشاهده در 1239 cm^{-1} بیانگر وجود پیوند کششی C-N در آمید نوع سوم می‌باشد [۱۴]. پیک موجود در 1038 cm^{-1} به علت پیوند هیدروژنی در SPI می‌باشد [۱].

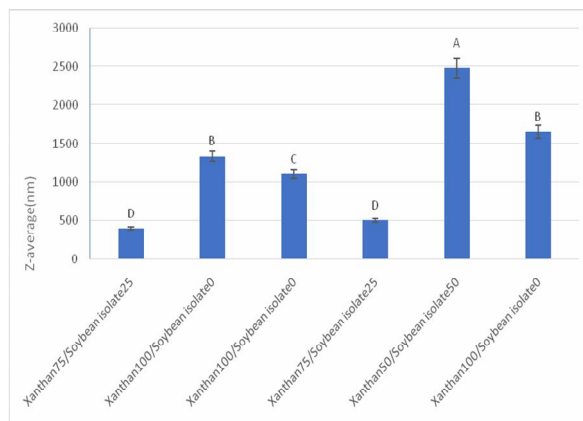


Fig 3 Z average of microencapsulated *L. acidophilus*

Table 2 Zeta potential of microencapsulated *L. acidophilus*

Sample	Zeta potential (mV)
Xanthan75/ Soy Protein Isolate 25	-2.56
Xanthan100/ Soy Protein Isolate 0	-3.33
Xanthan100/ Soy Protein Isolate 0	-12.3
Xanthan75/ Soy Protein Isolate 25	-13.7
Xanthan50/ Soy Protein Isolate 50	-10.6
Xanthan100/ Soy Protein Isolate 0	-7.11

کمترین پتانسیل زتا مربوط به نمونه با دیواره خالص صمغ زانتان بود. در حالیکه ترکیب صمغ زانتان با دیگر مواد دیواره ماتریس

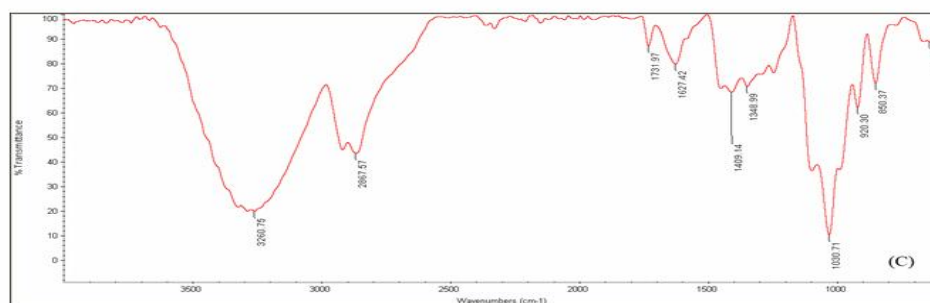
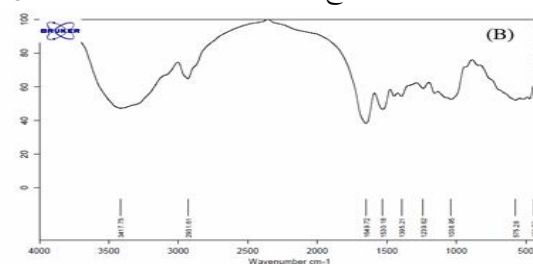
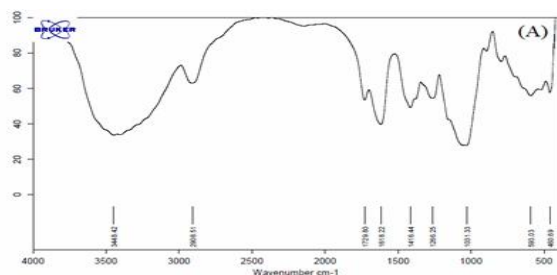


Fig 4 FTIR spectra of the optimum sample

(B) [۲۰]. پیک قابل توجه دیگر در 1729 cm^{-1} مرتبط با پیوند کششی ارتعاشی C=O است. پیک در 1618 cm^{-1} و 1416 cm^{-1} به علت پیوندهای ارتعاشی متقارن و نامتقارن -COO- است.

طیف مربوط به صمغ زانتان نشان دهنده‌ی پیک شاخص در 3448 cm^{-1} می‌باشد که بیانگر وجود پیوند کششی O-H و پیک دیگر 2908 cm^{-1} به دلیل پیوند کششی C-H می‌باشد (شکل ۴-۴)

دیواره سیستم است. این حالت به مقاومت در برابر نیروهای مکانیکی مرتبط با انبساط و باد کردن در طول خشک کردن پاششی کمک می‌کند. علاوه بر این می‌تواند با کاهش نفوذپذیری هوا باعث حفاظت بهتر از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک گردد. همچنین فرورفتگی‌هایی بر سطح نمونه مشاهده می‌شود که ممکن است این فرورفتگی‌ها مرتبط با دمای پایین در خشک کردن و ترکیب مواد مورد استفاده دیواره برای انکپسولاسیون باشد [۲۰]. همچنین این ناهمواری‌ها ممکن است ناشی از وجود پروبیوتیک در داخل کپسول‌ها باشد. نتایج مشابهی در این خصوص توسط Rajam و Anandharamakrishnan [۲۰] گزارش شد که بیان کردند سطحی بدون ترک و شکافتگی برای نمونه انکپسوله شده لاکتوباسیلوس پلانناروم با دیواره فروکتوالیگوساکارید مشاهده شد. به علاوه، Motalebi Moghanjoughi و همکاران در سال [۲۸] نتایج مشابهی برای میکروانکپسولاسیون لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم با دیواره پکتین و سدیم آلزینات گزارش کردند. به علاوه این نتایج در راستای یافته‌های Cabuk و Harsa [۲۹] و Amiri و همکاران [۳۰] برای درون پوشانی *L. acidophilus* با پولولان و پروتئین آب پنیر بود.

پیکشاکص در 1031 cm^{-1} نیز بیانگر پیوند کششی C-O-C است [۲۳].

پیک مربوط به نمونه بهینه حاوی SPI و صمغ زانتان نشان دهنده تغییر ناچیز در پیک‌های موجود در ناحیه جذبی می‌باشد. پیک جذبی در 2867 cm^{-1} به گروه‌های متقارن و نامتقارن C-H نسبت داده می‌شود [۱]. پیک‌های موجود در 910 cm^{-1} تا 1750 cm^{-1} مرتبط با وجود گروه‌های کربوکسیلیک اسید در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد [۱۵]. پیک جذبی قابل مشاهده در 1348 cm^{-1} مربوط به پیوند کششی C-N و پیوند خمشی N-H است [۱۵]. پیک در 1030 cm^{-1} بیانگر وجود پیوندهای ارتعاشی =CH و =CH₂ است [۱۴]. پیک‌های موجود در ۸۵۰ تا ۱۰۰۰ به علت وجود پیوندهای C-H منوساکارید است [۱۶].

۴-۵- میکروسکوپ الکترونی روبشی

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه انکپسوله شده *L. acidophilus* با دیواره صمغ زانتان، SPI و فروکتوالیگوساکارید در شکل (۵) آورده شده است. بر اساس تصاویر، سطحی صاف و یکنواخت و بدون ترک و شکاف بر سطح میکروکپسول‌ها مشاهده می‌گردد که نشان دهنده شکنندگی کمتر

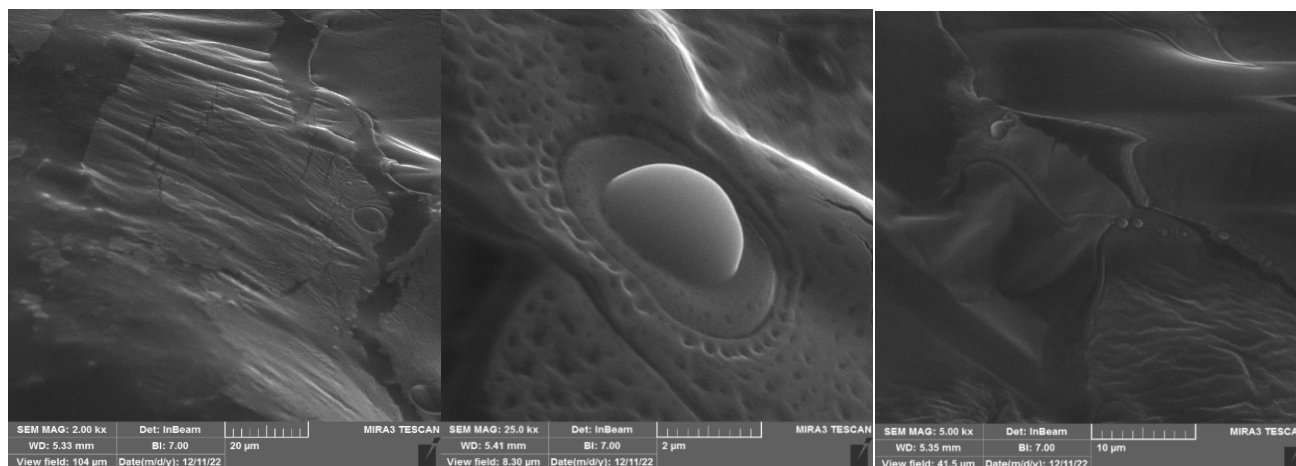


Fig 5 SEM micrographs of optimum sample

حداقل پتانسیل زتا و اندازه ذرات و کیفیت پودر خشک شده

انجمادی انتخاب شد. مطابق نتایج حاصل شده زنده مانی پروبیوتیک با افزایش غلظت SPI و صمغ زانتان به ترتیب افزایش و کاهش یافت. همچنین کارایی درون پوشانی در نتیجه

۵- نتیجه گیری

درون پوشانی پروبیوتیک *L. acidophilus* با نسبت‌های مختلف SPI، صمغ زانتان و فروکتوالیگوساکارید انجام شد. فرمولاسیون نمونه بهینه با حداکثر میزان کارایی درون پوشانی و

- [7] Azizi, S., Rezazadeh-Bari, M., Almasi, H., & Amiri, S. (2021). Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* using sesame protein isolate: Effect of encapsulation method and transglutaminase. *Food Bioscience*, 41, 101012.
- [8] Hazirah, M. N., Isa, M. I. N., & Sarbon, N. M. (2016). Effect of xanthan gum on the physical and mechanical properties of gelatin-carboxymethyl cellulose film blends. *Food Packaging and Shelf Life*, 9, 55-63.
- [9] Balasubramanian, R., Kim, S. S., Lee, J., & Lee, J. (2019). Effect of TiO₂ on highly elastic, stretchable UV protective nanocomposite films formed by using a combination of k-Carrageenan, xanthan gum and gellan gum. *International journal of biological macromolecules*, 123, 1020-1027.
- [10] Moradi, M., Daneshzad, E., & Azadbakht, L. (2020). The effects of isolated soy protein, isolated soy isoflavones and soy protein containing isoflavones on serum lipids in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(20), 3414-3428.
- [11] Li, C., Yang, F., Huang, Y., Huang, C., Zhang, K., & Yan, L. (2020). Comparison of hydrodynamic and ultrasonic cavitation effects on soy protein isolate functionality. *Journal of Food Engineering*, 265, 109697.
- [12] Bis-Souza, C. V., Pateiro, M., Domínguez, R., Penna, A. L., Lorenzo, J. M., & Barretto, A. C. S. (2020). Impact of fructooligosaccharides and probiotic strains on the quality parameters of low-fat Spanish Salchichón. *Meat science*, 159, 107936.
- [13] Mishra, S., & Mishra, H. N. (2013). Effect of synbiotic interaction of fructooligosaccharide and probiotics on the acidification profile, textural and rheological characteristics of fermented soy milk. *Food and Bioprocess Technology*, 6(11), 3166-3176.
- [14] Vaniski, R., da Silva, S. C., da Silva - Buzanello, R. A., Canan, C., & Drunkler, D. A. (2021). Improvement of *Lactobacillus acidophilus* La - 5 microencapsulation viability by spray - drying with rice bran protein and

افزایش موجب افزایش درصد صمغ زانتان بیشتر شد، اما افزایش SPI موجب کاهش کارایی درون پوشانی گردید. اندازه ذرات نمونه‌ها نیز با افزایش غلظت SPI افزایش یافت. آزمون FTIR و SEM برای مطالعه ریزساختار و مورفولوژی نمونه بهینه انجام شد. به طور کلی، بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان دریافت که ترکیب SPI و صمغ زانتان و فروکتوالیگوساکارید پتانسیل لازم برای درون پوشانی پروبیوتیک‌ها به عنوان مواد دیواره را دارند که می‌توانند برای غنی سازی محصولات غذایی مورد استفاده قرار گیرند.

۶- منابع

- [1] Amiri, S., Nezamdoost-Sani, N., Mostashari, P., McClements, D. J., Marszałek, K., & Mousavi Khaneghah, A. (2022). Effect of the molecular structure and mechanical properties of plant-based hydrogels in food systems to deliver probiotics: an updated review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-27.
- [2] Aspri, M., Papademas, P., & Tsaltas, D. (2020). Review on non-dairy probiotics and their use in non-dairy based products. *Fermentation*, 6(1), 30.
- [3] Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2012). Probiotic fermentation of plant based products: possibilities and opportunities. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(2), 183-199.
- [4] Zhang, L. D. H. (2020). Recent advances in probiotics encapsulation by electrospinning. *ES Food & Agroforestry*, 2, 3-12.
- [5] Jiang, Y., Zheng, Z., Zhang, T., Hendricks, G., & Guo, M. (2016). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCFM using polymerized whey proteins as wall material. *International journal of food sciences and nutrition*, 67(6), 670-677.
- [6] Shinde, T., Sun-Waterhouse, D., & Brooks, J. (2014). Co-extrusion encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* alone or together with apple skin polyphenols: An aqueous and value-added delivery system using alginate. *Food and Bioprocess Technology*, 7(6), 1581-1596.

- nanofibres using electrospinning technology. *Food Hydrocolloids*, 111, 106381.
- [22] Ribeiro, M. C. E., Chaves, K. S., Gebara, C., Infante, F. N., Grosso, C. R., & Gigante, M. L. (2014). Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. *Food Research International*, 66, 424-431.
- [23] Yasmin, I., Saeed, M., Pasha, I., & Zia, M. A. (2019). Development of whey protein concentrate-pectin-alginate based delivery system to improve survival of *B. longum* BL-05 in simulated gastrointestinal conditions. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(2), 413-426.
- [24] Huq, T., Frascini, C., Khan, A., Riedl, B., Bouchard, J., & Lacroix, M. (2017). Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin. *Carbohydrate polymers*, 168, 61-69.
- [25] Hosseini, S., Mohammadian, T., Abbaspour, M. and Alishahi, M. (2018). The effect of microencapsulation with alginate/chitosan on survival of probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum*) in the simulated condition of stomach and intestines in *Huso huso*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 27(2), 161-172.
- [26] Peinado, I., Lesmes, U., Andrés, A. and McClements, D. (2010). Fabrication and morphological characterization of biopolymer particles formed by electrostatic complexation of heat treated lactoferrin and anionic polysaccharides. *Langmuir*, 26(12), 9827-9834.
- [27] Duman, D., & Karadag, A. (2021). Inulin added electrospun composite nanofibres by electrospinning for the encapsulation of probiotics: characterisation and assessment of viability during storage and simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(2), 927-935.
- [28] Motalebi Moghanjoui, Z., Rezazadeh Bari, M., Alizadeh Khaledabad, M., Amiri, S., & Almasi, H. (2021). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA - 5 and maltodextrin. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(4), e15364.
- [15] Maleki, O., Khaledabad, M. A., Amiri, S., Asl, A. K., & Makouie, S. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in whey protein isolate-crystalline nanocellulose-inulin composite enhanced gastrointestinal survivability. *LWT*, 126, 109224.
- [16] Dehkordi, S. S., Alemzadeh, I., Vaziri, A. S., & Vossoughi, A. (2020). Optimization of alginate-whey protein isolate microcapsules for survivability and release behavior of probiotic bacteria. *Applied biochemistry and biotechnology*, 190(1), 182-196.
- [17] González-Ferrero, C., Irache, J. M., Marín-Calvo, B., Ortiz-Romero, L., Virto-Resano, R., & González-Navarro, C. J. (2020). Encapsulation of probiotics in soybean protein-based microparticles preserves viable cell concentration in foods all along the production and storage processes. *Journal of microencapsulation*, 37(3), 242-253.
- [18] Amiri, S., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Bari, M. R., & Khaledabad, M. A. (2019). Exopolysaccharides production by *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12: Optimization of fermentation variables and characterization of structure and bioactivities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 752-765.
- [19] Premjit, Y., & Mitra, J. (2021). Optimization of electrospray-assisted microencapsulation of probiotics (*Leuconostoc lactis*) in soy protein isolate-oil particles using Box-Behnken experimental design. *Food and Bioprocess Technology*, 14(9), 1712-1729.
- [20] Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 773-780.
- [21] Ma, J., Xu, C., Yu, H., Feng, Z., Yu, W., Gu, L., ... & Hou, J. (2021). Electro-encapsulation of probiotics in gum Arabic-pullulan blend

1233.

[30] Amiri, S., Teymorlouei, M. J., Bari, M. R., & Khaledabad, M. A. (2021). Development of Lactobacillus acidophilus LA5-loaded whey protein isolate/lactose bionanocomposite powder by electrospraying: A strategy for entrapment. *Food Bioscience*, 43, 101222.

Bifidobacterium animalis BB - 12 in pectin and sodium alginate: A comparative study on viability, stability, and structure. *Food Science & Nutrition*, 9(9), 5103-5111.

[29] Çabuk, B., & Harsa, Ş. (2015). Whey protein-pullulan (WP/Pullulan) polymer blend for preservation of viability of *Lactobacillus acidophilus*. *Drying Technology*, 33(10), 1223-



Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 with composite wall of xanthan gum, soy protein isolate and fructooligosaccharide: investigation microcapsule characteristics

Abbasi Ghaznaq, M. ¹, Rezazadeh Bari, M. ², Alizadeh Khaledabad, M. ³, Amiri, S. ^{4*}

1. PhD candidate of Food Biotechnology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

ABSTRACT

Encapsulation is an effective method to increase the viability of probiotic bacteria. The aim of this research is to determine the optimal formulation for microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 with soy protein isolate, xanthan gum and fructooligosaccharide as wall materials by freeze drying method. For this purpose, 19 treatments with Combine design were prepared by Design expert software. Encapsulation efficiency, particle size, zeta potential, and probiotic viability, FTIR and SEM tests were performed on the samples. The optimal sample was selected based on the lowest zeta potential and particle size, and the characteristics of microcapsules were determined by the aforementioned tests. The results showed that probiotic viability increased and decreased with increasing concentration of soy protein isolate and xanthan gum, respectively. The particle size of the samples also increased with increasing the concentration of soy protein isolate. In general, according to the protective effect of xanthan gum, soy protein isolate and fructooligosaccharide on probiotics, it can be concluded that these compounds can be used as a wall for coating to enrich food products.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2023/ 01/ 21
Accepted 2023/ 03/ 06

Keywords:

Soy protein isolate,
Fructooligosaccharide,
Encapsulation,
Xanthan gum,
Lactobacillus acidophilus PTCC 1643.

DOI: 10.22034/FSCT.19.133.69
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.24.9

*Corresponding Author E-Mail:
sa.amiri@urmia.ac.ir