

مقاله پژوهشی

بررسی ویژگی‌های ریزپوشانی توأم لاکتوباسیلوس پلانتاروم و

فیتواسترول با استفاده از روش کواسرواسیون

سهراب شریفی^۱، محمود رضازادباری^{۲*}، محمد علیزاده^۳، هادی الماسی^۴

۱. معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۲. دانشجوی دکتری تخصصی علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

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

۴. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

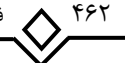
(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۱۹، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۸/۴/۶، تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۶)

چکیده:

ریزپوشانی توأم چند ترکیب در یک ماتریکس، باعث افزایش فعالیت زیستی آن‌ها نسبت به حالتی می‌شود که تک‌تک ریزپوشانی شوند. در این پژوهش، ایزوله پروتئین آب‌پنیر (WPI) و صمغ عربی (GA)، به‌عنوان مواد دیواره جهت ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم (P) و فیتواسترول (Ph)، از طریق کواسرواسیون استفاده شده است. ریزکپسول‌های مایع WPI-P-GA و WPI-P-Ph-GA توسط روش خشک‌کن پاششی و انجمادی به پودر تبدیل شدند. نتایج نشان داد که ماندگاری لاکتوباسیلوس پلانتاروم (در دو حالت مایع و جامد) در حضور فیتواسترول، نسبت به عدم حضور آن بهبود یافت و همچنین ماندگاری این باکتری در طول مدت‌زمان نگهداری (۶۰ روز) در روش خشک‌کن پاششی، نسبت به روش خشک‌کن انجمادی، افزایش قابل توجهی از خود نشان داد. کارایی ریزپوشانی در روش خشک‌کن پاششی نسبت به روش انجمادی، به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. اندازه ذرات ریزکپسول‌های WPI-P-GA و WPI-P-Ph-GA، به‌ترتیب $196/13 \pm 2/72$ و $366/05 \pm 0/56$ nm توسط دستگاه تفرق نور پویا تعیین شد. پیوندهای الکترواستاتیکی مورد نیاز، جهت تشکیل کواسروات‌ها، با استفاده از طیف‌نگاره فروسرخ تبدیل فوریه، به‌اثبات رسید. شکل ظاهری و سطح ریزکپسول‌های خشک‌شده، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

کلیدواژه‌ها: ریزپوشانی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، فیتواسترول، کواسرواسیون

* نویسنده مسئول: m.rezazadehbari@urmia.ac.ir



۱. مقدمه

پروبیوتیک‌ها به‌عنوان موجودات زنده‌ای تعریف می‌شوند که اگر به مقدار کافی مصرف شوند، اثرات سلامت‌زایی بر روی میزبان برجای می‌گذارند [۱]. از خواص این باکتری‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: بهبود تعادل میکروفلور روده [۲]، افزایش کارایی سیستم ایمنی، کاهش سطح کلسترول سرم، خاصیت ضدسرطانی و سنتز ویتامین [۳، ۴]. تمایل به مصرف غذاهای حاوی باکتری‌های پروبیوتیک، پیوسته در حال افزایش است و تخمین زده می‌شود که حدود ۶۵٪ از بازار غذاهای عملگر، مربوط به این نوع غذاها باشد [۵، ۶]. حفظ بقای باکتری‌ها در طول تولید، نگهداری و انتقال به سیستم گوارشی، هنوز یک چالش اساسی محسوب می‌شود [۷]. پروبیوتیک‌ها بعد از مصرف و ورود به سیستم گوارش، باید در برابر شرایط اسیدی معده، اسید صفرا، ترکیبات ضد میکروبی و سایر شرایط حاد محافظت شوند [۸]. ماندگاری پروبیوتیک‌ها به عوامل زیادی همچون گونه باکتریایی، نوع غذای حامل پروبیوتیک و شرایط فرآوری غذا بستگی دارد [۹]. لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم، از جمله رایج‌ترین گونه‌های تجاری باکتری مورد استفاده در صنعت غذا هستند [۱۰]. فیتواسترول، به‌عنوان یک استرول گیاهی، ساختاری مشابه کلسترول دارد، با این تفاوت که در یکی از زنجیره‌های کناری، از پیوندی دوگانه برخوردار است [۱۱]. نقش اصلی فیتواسترول در گیاهان، محافظت از غشای سلولی است (همچون نقش کلسترول در جانوران) [۱۲]. فیتواسترول‌ها می‌توانند باعث کاهش جذب کلسترول سرم و در نهایت کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی - شوند [۱۳]. فیتواسترول‌ها علاوه بر کاهش جذب کلسترول، فواید دیگری نیز دارند؛ مانند جلوگیری از انواع سرطان‌ها، مانند سرطان سینه، پروستات و روده بزرگ [۱۴]. همچنین تحریک سیستم ایمنی و محافظت از پوست [۱۵]. به‌دلیل ماهیت بالای چربی‌دوستی فیتواسترول‌ها، جذب ضعیف و مزه دهانی نامطبوع و همچنین حساس‌بودن به فساد اکسیداتیو، کاربرد آن‌ها در غذاهای عملگر محدود شده است [۱۶]. ریزپوشانی^۱ را می‌توان فرایندی قلمداد کرد که در

آن یک ترکیب مهم و حساس غذایی، به‌عنوان هسته (مواد فعال) توسط مواد دیواره، غشا و کپسول در برابر شرایط حاد محیطی، رطوبت، نور و سایر عوامل مضر محافظت می‌شود [۱۷، ۱۸]. ریزپوشانی توأم^۲ (بیشتر از یک ترکیب در یک پوشش) باعث افزایش فعالیت‌زیستی تمام ترکیبات نسبت به حالت جزبه‌جز می‌شود [۱۹]. ریزپوشانی توأم ترکیباتی با خصوصیات متفاوت، مثل فیتواسترول (ترکیب آب‌گریز) و باکتری پروبیوتیک (ترکیب آب‌دوست) در صنایع غذایی، بنا به دلایلی، به‌طور محدودی انجام شده است. اثر هم‌افزایی بین فیتواسترول و باکتری‌های پروبیوتیک، در برخی پژوهش‌ها گزارش شده است. آوایشه در سال ۲۰۱۳ طی پژوهشی گزارش داد که تلقیح توأم فیتواسترول و لاکتوباسیلوس‌ها در غذاهای عملگر، باعث کاهش بیشتر چربی سرم و در نتیجه کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی می‌شود [۲۰]. یکی از روش‌های ریزپوشانی، کواسرواسیون یا توده‌ای‌شدن است. کمپلکس کواسرواسیون، روشی بر پایه تشکیل کمپلکس بین پلیمرهای دارای بار مخالف است که به‌موجب آن، یک کمپلکس پلی‌الکترولیت تشکیل می‌شود؛ لازمه این فرایند، مخلوط‌کردن حداقل دو بیوپلیمر در شرایط خاصی (مانند pH، غلظت الکترولیت و دما) است که یکی از آن‌ها، بار منفی و دیگری بار مثبت دارد. در این حالت، فاز توده‌ای بیوپلیمرها (به‌دلیل جاذبه الکترواستاتیکی بین آن‌ها) و فاز سوپرناتانت از هم تفکیک می‌شوند و توده‌ها، ذرات جامد یا ریزقطره‌های مایع را می‌پوشانند [۲۱]. این فرایند، یک تفکیک فاز جاذبه‌ای مایع - مایع است که وقتی تعداد دو یا بیشتر پلی‌الکترولیت با بار مخالف تحت شرایط مناسب مخلوط می‌شوند، دو فاز مایع تشکیل می‌شود؛ فاز توده‌ای و فاز سوپرناتانت. فاز توده‌ای محلول پلیمری نسبتاً غلیظ شده است که در پوشینه‌دار کردن شرکت می‌کند. فاز سوپرناتانت، یک محلول پلیمر رقیق است و به‌عنوان محیط پیوسته که در آن تشکیل ریزکپسول‌ها اتفاق می‌افتد، عمل می‌کند [۲۲]. هیدروکلوئیدهای مختلفی در فرایند ریزپوشانی با توده‌های کمپلکس استفاده شده‌اند.

در این پژوهش، از ایزوله پروتئین آب پنیر^۳ (WPI) به‌عنوان

2. Co-encapsulation
3. Whey Protein Isolate

1. Encapsulation

جهت فعال شدن گرم‌خانه‌گذاری شد. این عمل ۲ تا ۳ بار تکرار شد تا تعداد باکتری‌ها به حد لازم برسد. سلول‌های میکروبی توسط سانتریفوژ یخچال‌دار (Eppendorf, model 5417R, Germany) با دور ۱۵۰۰ g و دمای 25°C ، به مدت ۱۵ دقیقه برداشت و دوبار با آب‌پیتون ۰/۱ درصد استریل شست‌و‌شو داده شدند [۲۳].

۲.۳. آماده‌سازی امولسیون

فیتواسترول‌ها به‌طور کلی نامحلول در آب هستند و طعم گچی نامطلوبی دارند؛ از این‌رو برای برطرف کردن این مشکل و نیز پخش بهتر و یکنواخت‌تر، می‌بایست ابتدا به امولسیون o/w تبدیل شوند. برای تهیه امولسیون ذکر شده، مقدار ۱۰ g فیتواسترول، ۱۰ g امولسیفایر LACTEM و ۱۱/۶۱ g روغن سویا در یک بشر، تا دمای $140^{\circ}\text{C} - 130^{\circ}\text{C}$ حرارت داده شدند و سپس به مدت ۲ دقیقه، با همزن آزمایشگاهی در دور ۷۰۰ rpm هم زده شد. سپس مقدار ۶۸/۳۹ g آب (با دمای 90°C) به فاز روغنی اضافه می‌شود. پس از اختلاط فاز آبی و فاز روغنی، عمل هم‌زدن در دور ۳۰۰۰ rpm، به مدت ۴ دقیقه انجام می‌شود و در نهایت امولسیونی یکنواخت و سفید به دست می‌آید [۲۴].

۲.۴. تولید میکروکپسول‌ها

ریزپوشانی توام لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و فیتواسترول به روش کواسرواسیون، مطابق روش Errate و همکاران با مقداری اصلاحات انجام شد [۲۵].

۲.۴.۱. تولید میکروکپسول WPI-P-GA

ابتدا در دمای محیط ۵۰۰ mL محلول (۵٪ w/v) ایزوله پروتئین آب‌پنیر آماده شد. سپس با استفاده از همزن مکانیکی در دور ۸۰۰ rpm، به مدت ۱۰ دقیقه هم زده و جهت هم‌وزن شدن بیشتر و تولید امولسیون o/w ، از همزن با دور بالا ۲۰۰۰۰ rpm، به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. ابتدا نوبت افزودن توده پروبیوتیک‌ها به امولسیون o/w بود. ۵۰۰ mL محلول (۲/۲۵٪ w/v) صمغ عربی به صورت قطره‌قطره

پلی‌کاتیون و از صمغ عربی (GA) نیز به‌عنوان پلی‌آنیون استفاده می‌شود. از آنجا که باکتری لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و فیتواسترول، هر دو از قابلیت‌های بالایی برای استفاده در مواد غذایی برخوردارند، ریزپوشانی توام این دو ماده می‌تواند در غنی‌سازی محصولات غذایی بسیار پرکاربرد باشد؛ لذا هدف از این بررسی، ریزپوشانی توام باکتری لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و فیتواسترول، تولید ریزکپسول‌های مایع و همچنین خشک کردن آن‌ها به دو روش خشک‌کن پاششی و خشک‌کن انجمادی است. در ادامه، ماندگاری لاکتوباسیلوس پلانٹاروم در حضور و عدم حضور فیتواسترول و همچنین در طی مدت زمان نگهداری (۶۰ روز) مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت، ویژگی‌های ساختاری ریزکپسول‌های خشک‌شده توسط هر دو خشک‌کن پاششی و انجمادی مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. مواد

فیتواسترول استفاده‌شده، از شرکت Shaanxi Guanjie چین، امولسی فایر لاکتیک اسید استر مونو دی‌گلیسرید^۲ (LACTEM) از شرکت Danisco دانمارک، ایزوله پروتئین آب‌پنیر از شرکت Hilmar ایالات متحده آمریکا، صمغ عربی از شرکت مرک آلمان تهیه شد؛ البته سایر مواد آزمایشگاهی به‌کار رفته در این پژوهش نیز از شرکت مرک آلمان فراهم شد.

۲.۲. آماده‌کردن باکتری‌های پروبیوتیک

لاکتوباسیلوس پلانٹاروم (*Lactobacillus plantarum* PTCC 1058) به‌عنوان باکتری مدل، در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. این باکتری به‌صورت خالص و لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران، در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری و جهت تکثیر به محیط کشت MRS براث منتقل شد.

لاکتوباسیلوس پلانٹاروم در شرایط هوازی در دمای 37°C

1. Gum Arabic
2. Lactic Acid Esters of Mono and Diglyceride



سیاله با قطر ۱/۵ mm صورت گرفت. دمای خوراک در °C ۳۰ ثابت نگه‌داشته شد. با توجه به مطالعات پیشین، دمای هوای ورودی °C ۱۵۰±۱، دبی هوای ورودی ۴۷±۲ m³/h و دبی خوراک ۱±۰/۱ L/h تعیین شد. دمای هوای خروجی در این شرایط °C ۶۴±۱ به‌دست آمد. میکروکپسول‌های خشک شده تا زمان مصرف، در دمای °C ۴ و تحت خلاء نگه‌داری شدند.

۲.۵. ارزیابی تأثیر فیتواسترول، کواسروات WPI-GA

و روش‌های مختلف خشک‌کردن بر روی ماندگاری باکتری ریزپوشانی‌شده

جهت شمارش باکتری *L. plantarum* ۱۰ g از میکروکپسول‌های ریزپوشانی‌شده (مایع و جامد) در ۹۰ mL پپتون واتر استریل ۰/۱ درصد ریخته شد، سپس جهت رهاسازی هرچه بهتر باکتری ریزپوشانی‌شده، مخلوط در کیسه استومیکر^۱ (Seward Laboratory, London, UK) (استریل با سرعت ۴۰۰ rpm به‌طور یکنواخت، به‌مدت ۲ دقیقه همگن شد. در ادامه با استفاده از محیط جامد MRS آگار (Scharlau, European Union) و روش رقت‌سازی، باکتری‌ها کشت داده شدند و به‌مدت ۴۸ ساعت، در دمای °C ۳۷ گرمخانه‌گذاری شدند و تعداد کلنی‌ها در هر رقت، شمارش شد.

۲.۶. بررسی ویژگی‌های شیمیایی و ساختار میکروکپسول‌های تولیدی

۲.۶.۱. تعیین اندازه ذرات، شاخص چندبسی پاشیدگی^۲ (PDI) و پتانسیل زتا^۳

اندازه ذرات، شاخص چندبسی پاشیدگی و پتانسیل زتا میکروکپسول‌های مایع، با استفاده از دستگاه تفرق نور پویا^۴ (Horiba مدل SZ-100 کشور ژاپن) اندازه‌گیری شد.

در حالی که محلول با سرعت ۴۰۰ rpm در حال همزدن بود، اضافه شد. pH امولسیون، جهت تحریک برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک بین ایزوله پروتئین آب‌پنیر و صمغ‌عربی، با اضافه‌کردن اسیدسیتریک ۱۰٪ به‌صورت قطره‌ای در ۳/۷۵ تنظیم شد. فرایند میکروانکپسولاسیون در دمای °C ۲۵ انجام و میکروکپسول‌های مایع، در دمای °C ۵، جهت اطمینان از کامل‌شدن کواسرواسیون، به‌مدت ۴۸ ساعت نگه‌داری شدند.

۲.۴.۲. تولید میکروکپسول WPI-P-Ph-GA

مراحل تهیه این نوع از میکروکپسول‌ها شبیه مرحله قبل هست با این تفاوت که پس از آماده‌شدن محلول (۵٪ w/v) ایزوله پروتئین آب‌پنیر ۳۰ g از امولسیون فیتواسترول به این محلول اضافه شد؛ قسمت دوم نیز نوبت افزودن توده پروبیوتیک‌ها به محلول بود.

۲.۴.۳. خشک‌کردن میکروکپسول‌ها

جهت بررسی ویژگی‌های ساختاری و شیمیایی، میکروکپسول‌های مایع با استفاده از خشک‌کن انجمادی و پاششی، خشک شدند.

۲.۴.۳.۱. خشک‌کن انجمادی

در این روش ابتدا نمونه به‌مدت یک شبانه‌روز در فریزر °C ۲۰- قرار گرفت و در روز بعد، به‌مدت ۲۴ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی (مدل LDL PLUS Alpha ساخت آلمان) با دمای °C ۸۰- در فشار ۰/۰۲ mbar خشک شد. میکروکپسول‌های خشک‌شده تا زمان مصرف در دمای °C ۴ و تحت خلاء نگه‌داری شدند.

۲.۴.۳.۲. خشک‌کن پاششی

در این پژوهش در فرایند خشک‌کردن، از خشک‌کن پاششی آزمایشی (مهم صنعت، نیشابور) استفاده شد. محفظه خشک‌کن، استوانه‌ای به قطر ۱ متر و ارتفاع ۲ متر، با قسمت تحتانی مخروطی شکل است. برای ارسال خوراک به افشانه، از پمپ پرستالیک استفاده شد. فرایند پاشش توسط نازل دو

1. Stomacher
2. Poly dispersity index
3. Zeta potential
4. Dynamic Light Scattering

جدول (۱) اندازه ذرات، شاخص چندبسی پاشیدگی و پتانسیل زتای ریزکپسول‌های مایع

Table (3) Median particle size, PDI and zeta potential of liquid coacervate

تیمار	اندازه ذرات (نانومتر)	چندبسی پاشیدگی	پتانسیل زتا (میلی ولت)
Treatment	Particle Size (nm)	PDI	Zeta potential (Mv)
WPI-GA	196.2 ^a ±13.72	0.78 ^a ±0.13	-24.13 ^a ±0.59
WPI-Ph-GA	366.5 ^b ±0.56	0.71 ^a ±0.05	-19.53 ^b ±2.46

تمام اعداد حاصل میانگین ± انحراف معیار هستند.

حروف بالانویس لاتین متفاوت بین میانگین‌ها در ستون‌های مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح (p < 0.05) است.

به مدت ۲۰ دقیقه در شیکر حمام آب گرم حرارت داده شد. سپس سوسپانسیون به دمای محیط رسید و در سه مرحله، چربی نمونه در دکانتور استخراج شد. در مرحله اول، ۲۰ mL اتانول، ۵۰ mL اتیل‌اتر و ۵۰ mL n-هگزان؛ در مرحله دوم، ۱۰ mL اتانول، ۵۰ mL اتیل‌اتر و ۵۰ mL n-هگزان؛ و در مرحله سوم ۵۰ mL اتیل‌اتر و ۵۰ mL n-هگزان استفاده شد. در هر مرحله، بعد از اضافه کردن محلول‌ها، دکانتور باید هم‌زده شود. در ادامه، فاز بالایی جمع‌آوری و توسط کاغذ صافی حاوی سولفات سدیم بدون آب (Anhydrous Na₂SO₄) Ika, model (RV 10BS99)، حلال تبخیر و سپس تحت سیستم نیتروژن، تا رسیدن به وزن ثابت، خشک شد. مقدار فیتواسترول کل با استفاده از معادله شماره (۲) به دست آمد.

معادله (۲)

$$\text{درصد فیتواسترول کل} = \frac{\text{جرم فیتواسترول جمع‌آوری شده}}{\text{جرم خشک کلماده}} \times 100$$

۲.۶.۳.۲ محاسبه فیتواسترول آزاد

جهت محاسبه میزان فیتواسترول آزاد، ابتدا ۵ g از میکروکپسول خشک‌شده در ۲۰۰ mL n-هگزان، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق حل شد، بعد با استفاده از کاغذ صافی صاف و توسط روتاری (Ika, model RV 10BS99) و سیستم نیتروژن تحت خلأ، حلال تبخیر و فیتواسترول استخراجی تا رسیدن به وزن ثابت، خشک شد. مقدار فیتواسترول آزاد، با استفاده از معادله شماره (۳) به دست آمد.

۲.۶.۲ اندازه‌گیری رطوبت و فعالیت آبی^۱ (a_w) میکروکپسول‌های خشک‌شده

مقدار رطوبت پودرها به روش وزنی، از طریق خشک کردن در آون (ساخت شرکت Memmert کشور آلمان) ۱۰۵ °C تا رسیدن به وزن ثابت تعیین شد [۲۶]. فعالیت آبی پودرها، با استفاده از دستگاه واتراکتیویته‌متر (ساخت شرکت Aqualab کشور آمریکا) در دمای ۲۰ °C تعیین شد.

۲.۶.۳ محاسبه کارایی ریزپوشانی

کارایی ریزپوشانی مطابق روش Di Battista و همکاران، طبق معادلات (۱، ۲ و ۳) انجام شد [۲۷]. معادله (۱):

$$\text{کارایی ریزپوشانی} = \frac{\text{جرم فیتواسترول ریزپوشانی شده}}{\text{جرم فیتواسترول کل}} \times 100 = \frac{\text{TP-FP}}{\text{TP}} \times 100$$

در معادله (۱)، TP^۲ و FP^۳ به ترتیب فیتواسترول کل (ریزپوشانی‌شده و ریزپوشانی‌نشده) و فیتواسترول آزاد (ریزپوشانی‌نشده) است.

۲.۶.۳.۱ محاسبه فیتواسترول کل

اساس این روش، مشابه روش ژبراست (که اکثراً برای اندازه‌گیری چربی لبنیات مورد استفاده قرار می‌گیرد). ابتدا ۴g میکروکپسول خشک‌شده در ۴۰ mL آب دیونیزه حل و تا ۶۵ °C حرارت داده شد. بعد از به هم زدن آرام، ۸ mL آمونیاک ۲۵ درصد به آن اضافه شد و دوباره تا دمای ۶۵ °C

1. water activity
2. Total phytosterol
3. Free phytosterol

$$۱۰۰ \times \frac{\text{جرم فیتواسترول آزاد جمع‌آوری شده}}{\text{جرم خشک کلماده}} = \text{درصد فیتواسترول آزاد}$$

تصادفی صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در سه تکرار و با استفاده از نرم‌افزار SAS و رسم نمودار نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel ۲۰۱۶ انجام شد.

۲.۶.۴. آزمون میکروسکوپی الکترونی روشی^۱ (SEM)

برای مشاهده ساختار سطحی و برآورد اندازه میکروکپسول‌های خشک‌شده از میکروسکوپ الکترونی پویشی TESCAN (مدل MIRA، ساخت جمهوری چک) استفاده شد. سطح نمونه‌ها توسط لایه‌ای از طلا پوشانده شد و از ولتاژ ۱۰ mV برای حداکثر بزرگ‌نمایی استفاده شد.

۲.۶.۵. طیف‌نگاره فروسرخ تبدیل فوریه^۲ (اسپکتروسکوپی FTIR)

ابتدا محلول حاوی میکروکپسول‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم و فیتواسترول، جهت اندازه‌گیری IR، خشک شد. برای تهیه قرص، پودر خشک‌شده با برمید پتاسیم با نسبت‌های ۱ به ۱۰ مخلوط شد و به‌منظور آنالیز در FTIR (شرکت Bruker مدل Vector-22 ساخت آلمان) در طیف cm^{-1} ۴۰۰-۴۰۰۰ قرار داده شد.

۲.۶.۶. آزمون تعیین فاز و ساختار میکروکپسول‌های تولیدی خشک‌شده

در این تکنیک، با استفاده از مکانیسم تفرق پراش اشعه-X (X-ray Diffraction)، توسط دستگاه پراش اشعه X (شرکت Bruker، مدل D8 advance، ساخت آلمان) انجام شد. به‌منظور تشخیص ساختار کریستالی و یا آمورف میکروکپسول‌های تولیدی الگوهای XRD توسط دستگاه پراش اشعه X انجام شدند. جمع‌آوری اطلاعات در دیفراکترومتر ۳۵ kV و در طول موج ۱-۵۴nm نانومتر انجام شد.

۲.۶.۷. آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل مربوط به آزمون‌ها، در قالب طرح کاملاً

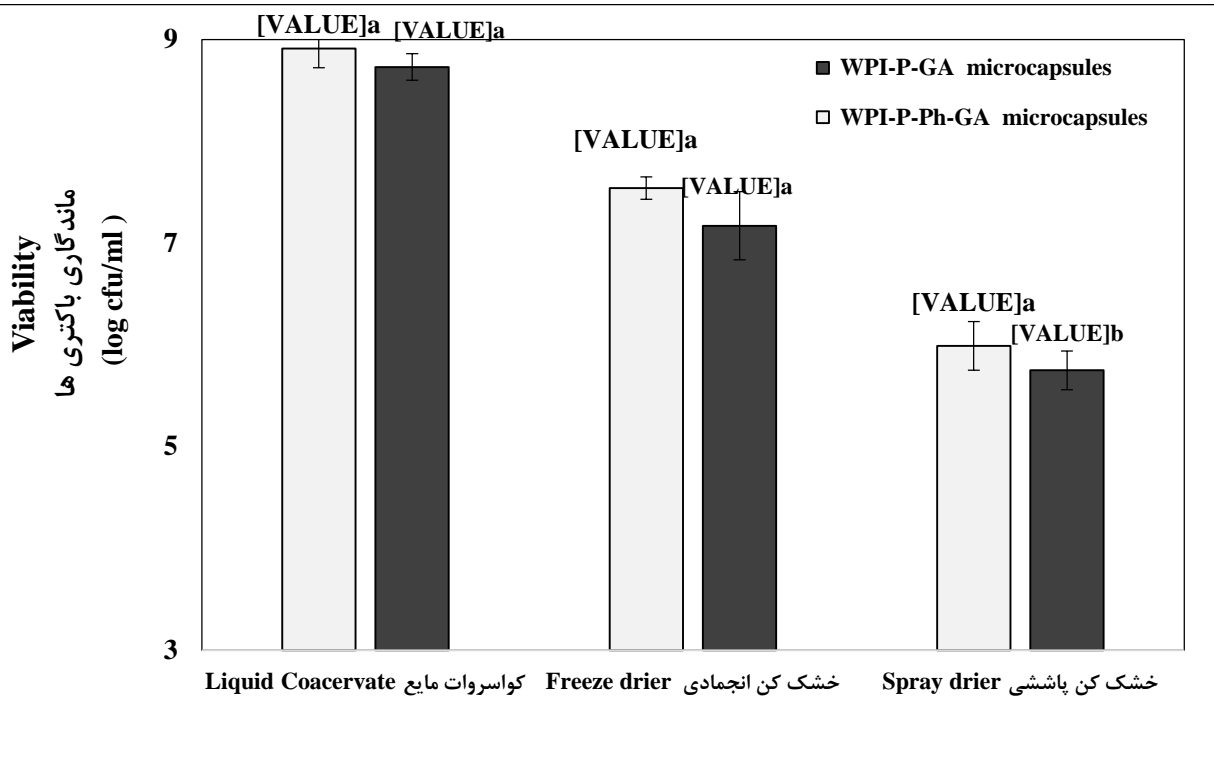
۳. نتایج و بحث

۳.۱. تأثیر روش‌های مختلف خشک‌کردن، فیتواسترول، کمپلکس WPI-GA بر روی ماندگاری لاکتوباسیلوس پلانتاروم (PTCC1۰۵۸) قبل و بعد خشک‌کردن و همچنین طی مدت نگهداری (۶۰ روز)

ماندگاری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در کواسروات‌ها، قبل از خشک‌کردن و همچنین بعد از خشک‌کردن، به دو روش پاششی و انجمادی در دو حالت کپسول توأم باکتری و فیتواسترول و کپسول حاوی باکتری تنها، در شکل ۱ نشان داده شده است.

همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، تعداد باکتری‌ها در کواسروات‌های مایع در کپسول توأم باکتری و فیتواسترول (WPI-P-Ph-GA) و کپسول باکتری (WPI-P-GA)، به ترتیب ۸/۹۱ و ۸/۷۳ بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ($p > 0.05$) با هم نداشتند؛ البته تعداد باکتری در حضور فیتواسترول، بیشتر از حالتی بود که فیتواسترول در کپسول وجود نداشت. این حالت ممکن است به دلیل اثر محافظت‌کنندگی فیتواسترول بر روی لاکتوباسیلوس پلانتاروم باشد. همچنین در دو حالت ریزکپسول‌های خشک‌شده به دو روش خشک‌کن پاششی و انجمادی نیز حضور فیتواسترول در کپسول باعث افزایش ماندگاری لاکتوباسیلوس پلانتاروم شد. با وجود آن‌که در ریزکپسول‌های خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی، این افزایش معنی‌دار نبود ولی در ریزکپسول‌های خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی، معنی‌دار بود. آویشه و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش دادند که مخلوطی از فیتواسترول، ایزوفلاون‌ها و اسیدهای چرب امگا۳، باعث افزایش ماندگاری باکتری لاکتوباسیلوس گاسری و بیفیدو باکتری اینفانتیس در محصولات لبنی تخمیری، طی فرآوری و همچنین مرحله نگه‌داری در شرایط سرد شد [۲۸].

1. Scanning Electron Microscopy
2. Fourier-transform infrared spectroscopy



شکل (۱) تعداد باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC 8014) در کواسروات های WPI-P-GA و WPI-P-Ph-GA در دو حالت مایع و خشک شده به روش های خشک کن انجمادی و پاششی

Fig (1) Cell viability of *L. plantarum* ATCC 8014 (CFU mL⁻¹) in WPI-P-GA and WPI-P-Ph-GA in liquid coacervate and in dried microcapsules.

فیتواسترول، باعث افزایش ماندگاری باکتری پروبیوتیک ل. پلانتاروم می شود. شکل (۱) نشان می دهد که در روش خشک کن انجمادی، نسبت به روش خشک کن پاششی، ماندگاری لاکتوباسیلوس پلانتاروم بیشتر است. اراته و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند، به دلیل دمای بالای مورد استفاده در این روش (دمای ورودی °C ۱۸۰ و دمای خروجی °C ۸۰) و همچنین مواجهه باکتری با استرس حرارتی و آبزدایی ناگهانی، نسبت به روش خشک کن انجمادی، درصد زندهمانی باکتری ها در این روش کمتر است [۳۲]. نتایج حاصل از تأثیر روش های مختلف خشک کردن، فیتواسترول و کواسروات WPI-GA بر روی درصد زندهمانی لگاریتمی لاکتوباسیلوس پلانتاروم، طی مدت زمان ۶۰ روز در جدول (۱) بیان شده است.

نتایج مطالعه حاضر همسو با نتایج این محققان است. پدروسو و همکاران در سال ۲۰۱۲، طی پژوهشی بیان کردند که میکرو ارگانسیم های ریزپوشانی شده در ماتریکس لیپیدی، دارای ماندگاری بیشتری نسبت به میکروارگانسیم های ریزپوشانی نشده در شرایط شبیه سازی شده روده و معده بودند [۲۹]. پیکوت و لاکروایکس در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که نفوذ اسید (یون های H⁺ و اکسیژن) در کپسول های بر پایه لیپیدی محدودتر است و این خود ممکن است باعث اثر محافظتی بر روی پروبیوتیک ها شود [۳۰]. پارسا و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که نرخ زندهمانی باکتری لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس LA-5 موجود در ماست، در حضور فیتواسترول افزایش می یابد که این به دلیل نقش فیتواسترول در تنظیم سیالیت و نفوذپذیری غشای سلولی است [۳۱]. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که وجود

جدول (۲) درصد لگاریتمی زنده‌مانی* لاکتوباسیلوس پلانتراروم در طی دوره نگهداری برحسب روز در تیمارهای مختلف در دمای ۲۵ °C

Table (1) Cell survival (%) of *L. plantarum* ATCC 8014 during storage (60 days) at 25 °C

مدت زمان نگهداری (روز)					تیمار Treatment
Storage (day)					
۶۰	۴۵	۳۰	۱۵	۱	
60	45	30	15	1	
59.51 ^{Bd}	60.21 ^{Bcd}	60.94 ^{Bc}	63.05 ^{Bab}	70.01 ^{Ba}	SD-WPI-P-GA
60.52 ^{Bb}	62.43 ^{Bb}	64.24 ^{Bab}	64.80 ^{Bab}	71.14 ^{Ba}	SD-WPI-P-Ph-GA
80.41 ^{Ab}	81.11 ^{Aab}	81.53 ^{Aab}	83.15 ^{Aab}	84.23 ^{Aa}	FD-WPI-P-GA
82.03 ^{Ab}	82.71 ^{Ab}	83.82 ^{Aab}	85.24 ^{Aab}	86.50 ^{Aa}	FD-WPI-P-Ph-GA

* میانگین ± انحراف معیار

حروف بالانویس بزرگ لاتین متفاوت بین میانگین‌ها در ستون‌های مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار درصد زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانتراروم در سطح (p < 0.05) است.

حروف بالانویس کوچک لاتین متفاوت بین میانگین‌ها در ردیف‌های مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار درصد زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانتراروم در سطح (p < 0.05) است.

ریزپوشانی شده توأم حاوی لاکتوباسیلوس کازئی ۴۳۱ و روغن ماهی تون^۱ (به‌عنوان منبع غنی از امگا۳) در کواسروات WPI و GA خشک‌شده به دو روش خشک‌کن پاششی و انجمادی پرداختند. بر طبق نتایج حاصله، نوع روش خشک‌کردن یکی از فاکتورهای مهم در زنده‌مانی باکتری‌ها محسوب می‌شود و درصد زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در روش خشک‌کن پاششی به دلیل استفاده از دمای بالا در طول این فرایند، کمتر از روش خشک‌کن انجمادی بود [۳۲].

۳.۲. تأثیر روش‌های مختلف خشک‌کردن، فیتواسترول، کمپلکس WPI-GA بر روی خصوصیات فیزیکوشیمیایی ریزکپسول‌های تولیدی
خواص فیزیکوشیمیایی (رطوبت، فعالیت آبی و کارایی ریزپوشانی فیتواسترول) ریزکپسول‌های خشک‌شده به دو روش خشک‌کن پاششی و انجمادی در جدول (۲) آورده شده است.

در جدول (۱) و (۲)، SD-WPI-P-GA و FD-WPI-P-GA، به ترتیب بیانگر کپسول حاوی باکتری، خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی و انجمادی است. همچنین SD-WPI-P-Ph-GA و FD-WPI-P-Ph-GA به ترتیب، بیانگر کپسول توأم حاوی باکتری و فیتواسترول، خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی و انجمادی است. درصد کاهش زنده‌مانی لگاریتمی لاکتوباسیلوس پلانتراروم از ۸۶/۵۰ - ۷۰/۰۱ در روز اول تا ۸۲/۰۳ - ۵۹/۵۱، در شصتین روز، در هر چهار تیمار مشاهده شد. روش خشک‌کن انجمادی، دارای کمترین نرخ کاهش و روش خشک‌کن پاششی دارای بیشترین نرخ کاهش درصد زنده‌مانی لگاریتمی بودند. به‌طور کلی، کپسول حاوی لاکتوباسیلوس پلانتراروم و فیتواسترول خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی (FD-WPI-P-Ph-GA) دارای کمترین نرخ کاهش و کپسول حاوی باکتری خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی (SD-WPI-P-GA)، دارای بیشترین نرخ کاهش درصد زنده‌مانی لگاریتمی تعداد باکتری بودند.
ارائه و همکاران طی پژوهشی در سال ۲۰۱۵ به تولید پودر

جدول (۳) ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ریزکپسول‌های خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی و انجمادی

Table (2) Physicochemical properties of spray and freeze-dried microcapsules.

کارایی ریزپوشانی (%) Efficiency Encapsulation (%)	فعالیت آبی Water activity	رطوبت (%) Moisture (%)	تیمار Treatment
-	0.127±0.002 ^d	3.02±0.01 ^d	SD-WPI-P-GA
-	0.197±0.003 ^b	3.71±0.01 ^b	FD-WPI-P-GA
59.26±0.03 ^a	0.148±0.001 ^c	3.37±0.02 ^c	SD-WPI-P-Ph-GA
44.99±0.95 ^b	0.251±0.001 ^a	3.96±0.01 ^a	FD-WPI-P-Ph-GA

تمام اعداد حاصل میانگین ± انحراف معیار هستند.

حروف بالانویس لاتین متفاوت بین میانگین‌ها در ستون‌های مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح (p < 0.05) است.

کوئیسپ - کوندوری و همکاران در سال ۲۰۱۱، هنگام مطالعه کارایی ریزپوشانی، دو روش خشک‌کن پاششی و انجمادی مشاهده شد [۳۷، ۳۲].

۳.۳. اندازه ذرات، زتاپتانسیل و شاخص چندبسی

پاشیدگی (PDI) کواسروات‌های تولیدی

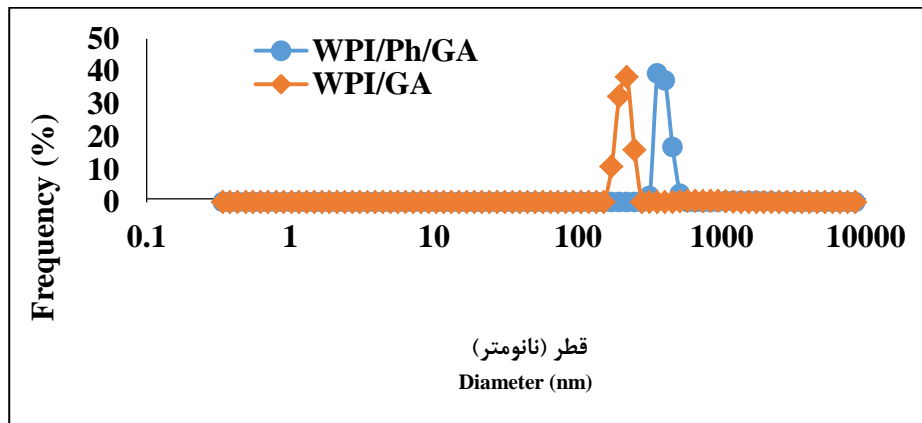
به‌منظور بررسی تأثیر فیتواسترو بر روی اندازه ذرات، شاخص چندبسی پاشیدگی و زتاپتانسیل کواسروات‌های مایع WPI-GA و WPI-Ph-GA تهیه شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که فیتواسترو، تأثیر معنی‌داری ($p < 0.05$) بر روی اندازه ذرات و زتاپتانسیل کواسروات‌های تولیدی داشت؛ هرچند که تأثیر معنی‌داری بر روی مقدار شاخص چندپاشیدگی نداشت. میانگین اندازه ذرات کواسروات‌های مایع WPI-GA $137/2 \pm 196/2$ nm با ورود فیتواسترو به سیستم (WPI-Ph-GA) اندازه ذرات افزایش یافت (nm) $366/5 \pm 10/56$.

در مطالعه چوبی و همکاران (۲۰۱۰) بتاسیکلودکسترین (پلیمر محلول در آب) و پلیکاپرولاکتون (پلیمر نامحلول در آب) به‌عنوان مواد دیواره به‌منظور ریزپوشانی روغن ماهی مورد استفاده قرار گرفت. براساس مطالعه انجام‌شده، غلظت روغن ماهی تأثیر قابل‌توجهی در اندازه ذرات داشته است. میانگین اندازه ذرات در این پژوهش در ماده دیواره بتاسیکلودکسترین حاوی روغن ماهی، $250-700$ nm بوده است. روغن ماهی کپسوله‌شده با پلیکاپرولاکتین دارای کوچکترین اندازه 200 nm بودند و با افزایش غلظت روغن ماهی، اندازه ذرات افزایش یافته است. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، همسو با این نتایج است [۳۸]. همچنین نتایج مطالعات گذشته نشان داد که میانگین اندازه ذرات ریزکپسول‌های تولیدی به‌روش کواسرواسیون در محدوده $500-1$ μm قرار داشت [۳۹]. بررسی نتایج حاصله نشان داد که شاخص چندبسی پاشیدگی در کواسروات‌های WPI-GA و WPI-Ph-GA، به‌ترتیب $0/78$ و $0/71$ است. پتانسیل زتا یا الکتروستاتیک، اختلاف پتانسیل بین لایه یونی متحرک و لایه غیرمتحرک است و بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطحی دیسپرسیون است، زیرا

فعالیت آبی و رطوبت ریزکپسول‌های تولیدی، به دو روش خشک‌کن انجمادی و پاششی، به‌ترتیب کمتر از $0/251$ و 4% (w/w) بود. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود، مقدار رطوبت و فعالیت آبی ریزکپسول‌های تولیدی به روش خشک‌کن انجمادی (FD-WPI-P-GA و FD-WPI-P-Ph-GA) در سطح معنی‌داری ($p < 0.05$) بیشتر از ریزکپسول‌های تولیدی به روش خشک‌کن پاششی (SD-WPI-P-GA و SD-WPI-P-Ph-GA) است. همچنین محتوی رطوبت و فعالیت آبی در ریزکپسول‌های خشک‌شده، توسط هر دو روش خشک‌کن پاششی و انجمادی در حضور فیتواسترو (SD-WPI-P-Ph-GA و FD-WPI-P-Ph-GA) در سطح معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به حالت عدم حضور فیتواسترو (SD-WPI-P-GA و FD-WPI-P-GA) بالاتر است. گاردینر و همکاران در سال ۲۰۰۰، تأثیر رطوبت را بر روی ماندگاری و پایداری پودر حاوی باکتری پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس سالیواریوس UCC 118 و لاکتوباسیلوس پاراکازئی NFBC338) بررسی کردند. نتایج این محققان نشان داد ماندگاری این باکتری‌ها در میزان رطوبت 4% (و کمتر از آن) بهبود یافت [۳۳]. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، در پودر حاصل از هر دو روش خشک‌کن پاششی و انجمادی، تیمارهای دارای فیتواسترو (SD-WPI-P-Ph-GA و FD-WPI-P-Ph-GA)، مقدار رطوبت بیشتر است. محققان زیادی گزارش کردند که وجود روغن در ریزکپسول‌ها، باعث تبخیر کمتر آب (طی فرایند خشک‌کردن) و در نتیجه افزایش رطوبت می‌شود [۳۵، ۳۴]. کارایی ریزپوشانی، پتانسیل روش ریزپوشانی در دام‌انداختن مواد هسته را مشخص می‌کند. نتایج مطالعات گذشته، کارایی انکپسولاسیون در محدوده $5-95\%$ ، با توجه به روش ریزپوشانی، روش خشک‌کردن مواد دیواره و همچنین نسبت مواد دیواره به هسته را مشخص کرده است [۳۶]. جدول ۲، کارایی ریزپوشانی فیتواسترو دو روش خشک‌کن پاششی و انجمادی را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که کارایی ریزپوشانی در روش خشک‌کن پاششی ($59/26$) به‌طور معنی‌داری نسبت به روش خشک‌کن انجمادی ($44/99$) بیشتر بود. نتایج مشابهی توسط اراته و همکاران در سال ۲۰۱۵ و

خود قرار دارد؛ بنابراین دارای بار مثبت است. پتانسیل زتای منفی به دست آمده نشان‌دهنده بیشتر بودن چگالی بار GA نسبت به WPI است. کاهش زتاپتانسیل بعد از ورود فیتواسترول به سیستم را می‌توان به واکنش آن با مواد دیواره در سطح نسبت داد.

نشان‌دهنده میزان تجمع بار در لایه غیرمتحرک و شدت جذب یون‌های مخالف به سطح ذره است [۴۰]. پتانسیل زتا برای کواسروات‌های WPI-GA و WPI-Ph-GA، به ترتیب ۲۴/۱۳- mV و ۱۹/۵۳- اندازگی‌گیری شد. به دلیل این‌که WPI در کواسروات‌های آماده‌شده در زیر نقطه ایزوالکتریک



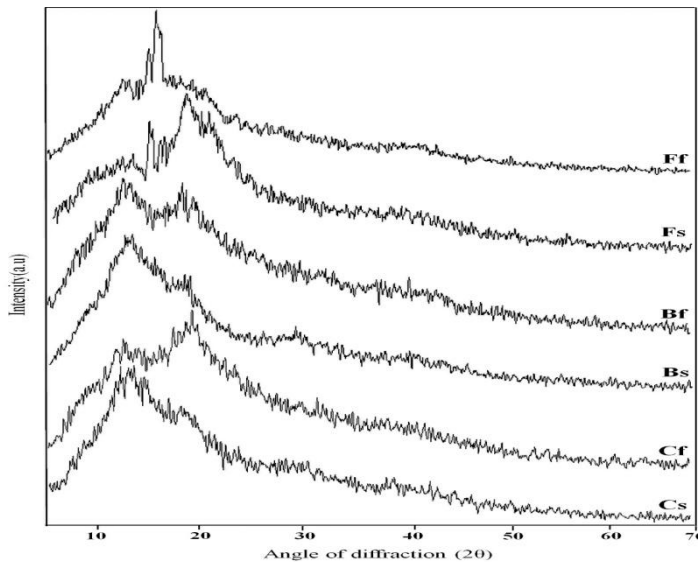
شکل (۲) توزیع اندازه ذرات کواسروات‌های WPI-Ph-GA و WPI-GA

Fig (2) Size distribution of WPI-Ph-GA and WPI-GA coacervates.

مقایسه دو نمونه Cs و Cf، نشان می‌دهد که کمپلکس WPI و صمغ عربی، یک ساختار نیمه‌بلورین با پیک پراش نسبتاً تیز تشکیل داده است. با این وجود، روش خشک کردن بر روی ماهیت ساختاری کمپلکس تشکیل شده مؤثر بوده است؛ به طوری که نمونه خشک شده با خشک کن پاششی، یک پیک شاخص در 2θ برابر با $14/7$ درجه نشان داد. در حالی که در نمونه خشک شده به روش انجمادی، دو پیک در زوایای $14/6$ و $20/2$ درجه مشاهده شد. این تفاوت نشان می‌دهد که نوع روش خشک کردن، بر روی شبکه بلورین و ساختار کمپلکس-های بیوپلیمری مؤثر است و می‌تواند نوع و اندازه بلورهای تشکیل شده را تحت تأثیر قرار دهد. در روش خشک کردن پاششی، به دلیل استفاده از دماهای بالاتر و احتمال شکست ساختاری بیشتر در بیوپلیمرها، تعداد و شدت پیک‌ها و در نتیجه درجه بلورینگی کمپلکس کمتر از روش خشک کردن انجمادی است که از دماهای پایین، برای خشک کردن استفاده شده است.

۳.۴. آزمون تفرق پراش اشعه X (X-ray Diffraction)

یکی از روش‌های پی‌بردن به ماهیت کریستاله بودن یا آمورف بودن یک ماده، آزمون تفرق پراش اشعه ایکس است. در حالت کلی، مواد دارای ساختار کریستالی در گراف XRD پیک شارپ و تیزی را از خود نشان می‌دهند؛ در صورتی که مواد دارای ساختار آمورف، دارای پیک پهن و الگوی گسترده تری هستند [۴۱]. الگوهای پراش اشعه ایکس تیمارهای مختلف کواسروات‌های WPI-GA خشک شده به روش خشک کن پاششی (Cs)، کواسروات‌های WPI-GA خشک شده به روش خشک کن انجمادی (Cf)، کواسروات‌های حاوی باکتری WPI-P-GA خشک شده به روش خشک کن پاششی (Bs)، کواسروات‌های حاوی باکتری WPI-P-GA خشک شده به روش خشک کن انجمادی (Bf)، کواسروات‌های حاوی باکتری و فیتواسترول WPI-P-Ph-GA خشک شده به روش خشک کن پاششی (Fs) و کواسروات‌های حاوی باکتری و فیتواسترول WPI-P-Ph-GA خشک شده به روش خشک کن انجمادی (Ff) در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل (۳) الگوهای پراش اشعه مربوط به (Cs) کواسروات‌های WPI-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی، (Cf) کواسروات‌های WPI-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی، (Bs) کواسروات‌های حاوی باکتری WPI-P-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی، (Bf) کواسروات‌های حاوی باکتری WPI-P-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی، (Fs) کواسروات‌های حاوی باکتری و فیتواسترول WPI-P-Ph-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی و (Ff) کواسروات‌های حاوی باکتری و فیتواسترول WPI-P-Ph-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی.

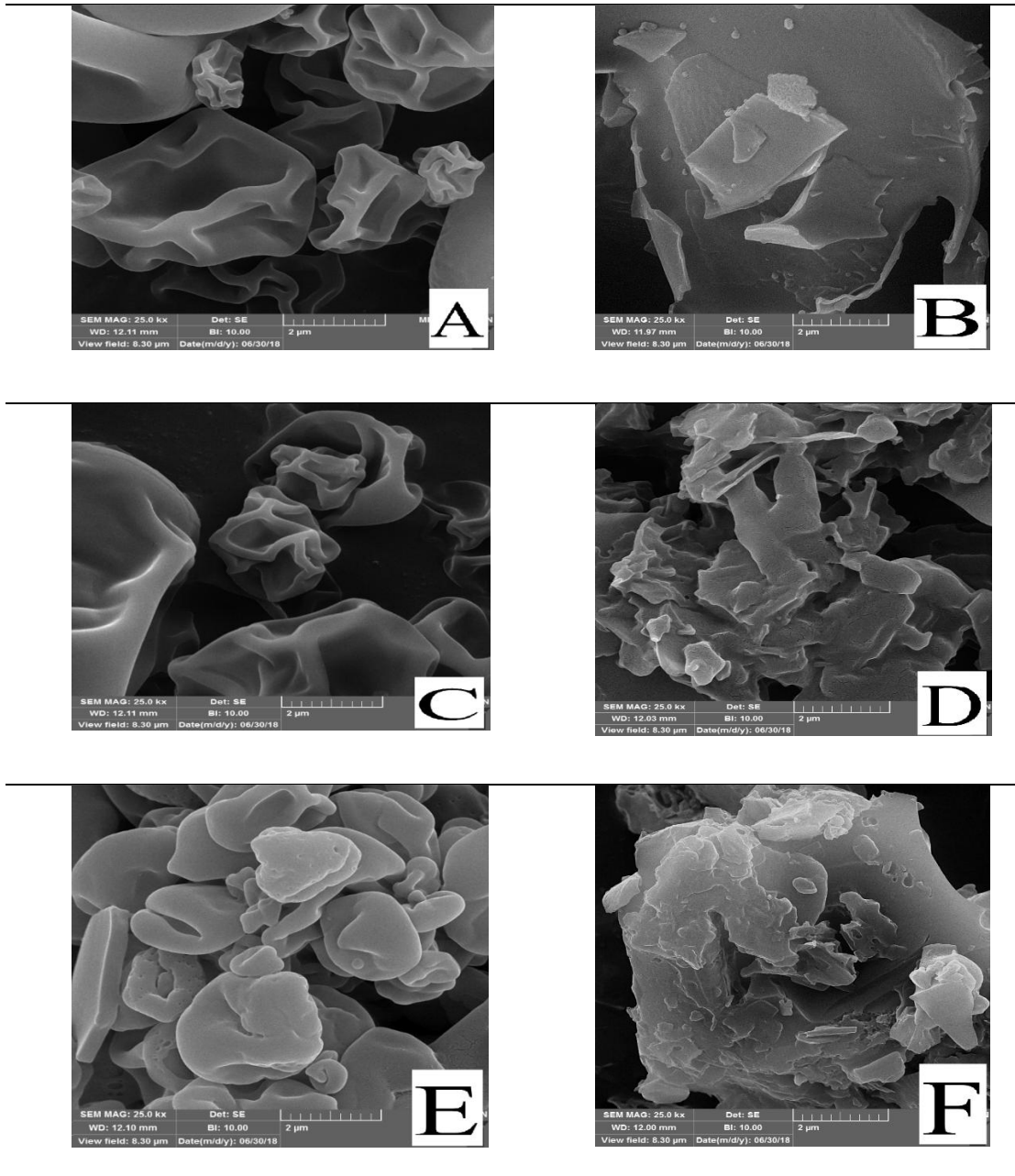
Fig (3) X-ray diffractograms solid microcapsules. (Cs) Spray dried WPI-GA microcapsules (control); (Cf) Freeze-dried WPI-GA microcapsules (control); (Bs) Spray dried WPI-P-GA microcapsules; (Bf) Freeze-dried WPI-P-GA microcapsules; (Fs) Spray dried WPI-P-Ph-GA microcapsules; (Ff) Freeze-dried WPI-P-Ph-GA microcapsules.

شیمیایی، تأثیری بر ساختار بیوپلیمرها ندارد، اما زمانی که از فیتواسترول و سایر ترکیبات استفاده می‌شود، احتمال تشکیل پیوندهای جدید و نفوذ این ترکیبات به داخل ماتریکس بیوپلیمری، باعث ایجاد تغییر در ساختار بلورین کمپلکس می‌شود. نتایج تحقیق بوتترول و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داد که به دلیل حلالیت بالا و خاصیت جذب آب بیشتر ترکیبات دارای ساختار آمورف، فرایند رهاسازی این ترکیبات، هنگام ریزپوشانی آسان‌تر صورت می‌گیرد [۴۲].

۳.۵. نتایج آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی

برای آگاهی از چگونگی و ریخت‌شناسی ساختار ریزکپسول‌ها، شکل ۴ تصاویری از نمونه‌ها را توسط میکروسکوپ الکترونی (در مقیاس ۲ μm) روبشی نشان می‌دهد. شکل ظاهری ریزکپسول‌ها مستقیماً چگالی توده، جریان‌پذیری و خواص آگیری ریزکپسول‌های خشک‌شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۴۳].

با توجه به نمونه‌های BS و Bf، می‌توان دریافت که وارد کردن باکتری به داخل کمپلکس بیوپلیمری، هیچ‌گونه تأثیری بر روی ماهیت بلورین ترکیب WPI و صمغ عربی نداشته است و تمام پیک‌های قبلی با همان مشخصات، در نمونه‌های بارگذاری شده با باکتری ظاهر شده‌اند. با افزودن فیتواسترول و سایر ترکیبات (مثل روغن سویا و امولسیفایر لاکتم)، تفاوت چشمگیری در پراش نگاره‌های XRD ظاهر شد. در نمونه خشک‌شده با خشک‌کن پاششی، پیک پراش اصلی از زاویه ۱۴/۷ درجه به ۲۰ درجه منتقل شد و در نمونه خشک‌شده با روش انجمادی، به جای دو پیک شاخص، یک پیک تیز در زاویه ۱۶/۱ درجه مشاهده شد. این مشاهدات نشان از تغییر در ساختار شبکه بیوپلیمری و نوع کریستال‌های تشکیل‌شده پس از افزودن فیتواسترول، روغن سویا و سایر ترکیبات دارد. نتایج آزمون XRD نشان می‌دهد که علاوه بر روش خشک‌کردن، نوع مواد افزودنی نیز بر روی ماهیت بلورین کمپلکس WPI و صمغ عربی مؤثر است. باکتری آزاد به دلیل عدم توانایی در برقراری اتصالات



شکل (۴) تصاویر میکروسکوپ الکترونی یا SEM مربوط به (A): ریزکپسول‌های WPI-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی، (B): ریزکپسول‌های WPI-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی، (C): ریزکپسول‌های حاوی باکتری WPI-P-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی، (D): ریزکپسول‌های حاوی باکتری WPI-P-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی، (E): ریزکپسول‌های حاوی باکتری و فیتواسترول WPI-P-Ph-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی و (F): ریزکپسول‌های حاوی باکتری و فیتواسترول WPI-P-Ph-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی

Fig (4) SEM micrographs of dried microcapsules. (A) Spray dried WPI-GA microcapsules (control); (B) Freeze dried WPI-GA microcapsules (control); (C) Spray dried WPI-P-GA microcapsules containing probiotic; (D) Freeze dried WPI-P-GA microcapsules containing probiotic; (E) Spray dried WPI-P-Ph-GA microcapsules containing probiotic and phytosterol; (F) Freeze dried WPI-P-Ph-GA microcapsules containing probiotic and phytosterol.

خشک کن انجمادی، به دلیل تصعید فوری آب یخ زده از سطح دیواره ریزکپسول‌ها است که در نتیجه آن، حفرات و منافذی (زمان لازم برای تشکیل چروکیدگی وجود ندارد) در سطح کریستال‌های یخ تشکیل می‌شود [۴۹].

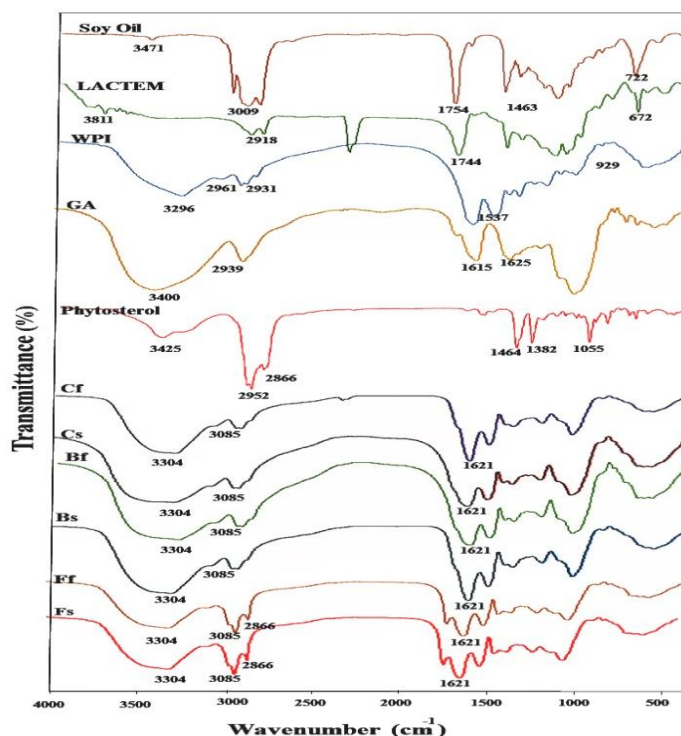
۳.۶. طیف نگاره فروسرخ تبدیل فوریه (اسپکتروسکوپی IR - FT)

طیف نگاره فروسرخ، تشخیص گروه‌های شیمیایی اصلی در پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها و تغییر و تشکیل برهمکنش‌های جدید را میسر می‌سازد، چون عدد موجی و شدت پیوندها و گروه‌ها برای هر پلی‌ساکارید و پروتئینی اختصاصی است [۵۰].

شکل ۵، طیف نگاره فروسرخ را برای مواد اولیه صمغ‌عربی (GA)، پروتئین ایزوله آب‌پنیر (WPI)، فیتواسترول، امولسیفایر LACTEM، روغن سویا، کواسروات‌های WPI-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی (Cs)، کواسروات-های WPI-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی (Cf)، کواسروات‌های حاوی باکتری WPI-P-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی (Bs)، کواسروات‌های حاوی باکتری WPI-P-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی (Bf)، کواسروات‌های حاوی باکتری و فیتواسترول WPI-P-Ph-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی (Fs) و کواسروات‌های حاوی باکتری و فیتواسترول WPI-P-Ph-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی (Ff) نشان می‌دهد.

طیف FTIR، مربوط به فیتواسترول خالص، حاکی از وجود یک پیک شاخص در عدد موجی 3425 cm^{-1} است که نشان دهنده وجود باندهای کششی O-H است. طیف FTIR فیتواسترول نشان داد که این ماده، دارای گروه CH_3 در عدد موجی 2952 cm^{-1} ، گروه CH_2 در عدد موجی 2868 cm^{-1} و گروه‌های n (CH_2) در عدد موجی 1464 cm^{-1} ، گروه $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ در عدد موجی 1382 cm^{-1} و باندهای کششی C-OH الکل نوع دوم در عدد موجی 1055 cm^{-1} است. نتایج حاصله و طیف مربوط به فیتواسترول، مشابه نتایج حاصل از پژوهش یانگ و همکاران در سال ۲۰۱۶ است [۵۱].

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، ریزکپسول‌های خشک‌شده توسط روش خشک‌کن انجمادی ظاهری کاملاً متخلل و اسفنج‌مانند دارند و فاقد هرگونه شکل و ساختار مشخصی هستند، در صورتی که ریزکپسول‌های خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی دارای شکلی نیم‌کره و مقعر و همچنین دارای سطحی چروکیده و دنداندار هستند. هاقو و رووس، طی پژوهشی که در سال ۲۰۰۶ انجام شد، ریخت-شناسی مشابهی را برای ریزکپسول‌های خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی گزارش کردند [۴۴]. تشکیل حالت تقعر در سطح ریزکپسول‌های خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی ممکن است به دلیل استفاده از دمای بالای استفاده شده و همچنین تبخیر سریع رطوبت در این روش باشد [۳۲، ۴۵]. یانگ و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ ساختار دنداندار و مقعری را بر روی سطح ریزکپسول‌های خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی و سطوح چروکیده‌ای را برای ریزکپسول‌های خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی گزارش کردند [۴۶]. در شکل ۴، تیمار دارای WPI-P-Ph-GA (شکل ۴: E) به دلیل دارا بودن فیتواسترول در ساختار خود، سطحی به نسبت صاف‌تر و چروکیدگی کمتر نسبت به تیمارهای WPI-P-GA و WPI-GA (به ترتیب تصاویر C و A در شکل ۴) داشت. وجود فیتواسترول در ساختار WPI-P-Ph-GA باعث کاهش تبخیر رطوبت و در نتیجه کاهش چروکیدگی در سطح ریزکپسول شده است. از شکل ۴ پیداست که در ریزکپسول‌های خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی نیز تیمار کنترل WPI-GA (شکل ۴: B) دارای سطح صاف‌تری نسبت به تیمارهای دارای باکتری WPI-P-GA (شکل ۴: D) و تیمار دارای باکتری و فیتواسترول WPI-P-Ph-GA (شکل ۴: F) بودند. چروکیدگی سطح ریزکپسول‌ها مربوط به تبخیر آب از سطح این ریزکپسول‌هاست. در روش خشک‌کن انجمادی نیز، ریزکپسول‌های حاوی فیتواسترول WPI-P-Ph-GA (شکل ۴: F) دارای سطح صاف‌تری بودند که به علت ممانعت فیتواسترول از تبخیر هرچه بیشتر آب و در نتیجه افزایش رطوبت ریزکپسول‌ها است. این نتایج، مشابه دستاوردهای مطالعات گذشته است [۴۷، ۴۸]. سطح صاف و بدون چروکیدگی ریزکپسول‌های حاصل از روش



شکل (۵) طیف نگار فرسرخ روغن سویا، امول سیفایر، LACTEM، WPI، GA، فیتواسترول و کواسروات‌های WPI-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی (Cs)، کواسروات‌های WPI-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی (Cf)، کواسروات‌های حاوی باکتری WPI-P-GA خشک شده به روش خشک‌کن پاششی (Bs)، کواسروات‌های حاوی باکتری WPI-P-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی (Bf)، کواسروات‌های حاوی باکتری و فیتواسترول WPI-P-Ph-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن پاششی (Fs) و کواسروات‌های حاوی باکتری و فیتواسترول WPI-P-Ph-GA خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی (Ff)

Fig (5) FT-IR spectra of Soy oil, LACTEM, WPI, GA, Phytosterol, (Cf) Freeze-dried WPI-GA microcapsules (control); (Cs) Spray dried WPI-GA microcapsules (control); (Bf) Freeze-dried WPI-P-GA microcapsules; (Bs) Spray dried WPI-P-GA microcapsules; (Ff) Freeze-dried WPI-P-Pf-GA microcapsules; (Fs) Spray dried WPI-P-Ph-GA microcapsules.

باکتری (تیمارهای Bf و Bs) و همچنین تغییر در روش خشک‌کردن (تیمارهای Bf و Bs)، باعث هیچ‌گونه تغییر در ظاهر طیف‌های FTIR نشده‌است؛ به عبارت دیگر، پیک‌های Bf، Bs، Cf و Cs هیچ‌گونه تفاوتی با هم نداشتند. بررسی تیمارهای دارای فیتواسترول (Fs و Ff)، نشان داد که پیکی با شدت کم در عدد موجی 2866 cm^{-1} ، در این دو تیمار ظاهر شده که مربوط به گروه‌های CH_2 فیتواسترول ریزپوشانی‌شده است. ناپدیدشدن پیک‌های در محدوده ۵۰۰ تا 1500 cm^{-1} در فیتواسترول، لاکتم و روغن سویا حاکی از موفق‌آمیزبودن فرایند ریزپوشانی است. در نهایت مقایسه طیف FTIR دو تیمار Fs و Ff، نشان داد که روش خشک کردن نیز تأثیری در تغییر گروه‌های عاملی ریزکپسول‌ها ندارد.

نتایج حاصل از طیف‌های مواد اولیه در این پژوهش، مشابه طیف مواد اولیه در مطالعات سایر پژوهش‌گران بود، روغن سویا [۵۲]، WPI [۵۳] و GA [۵۴، ۵۵]. در فرایند کواسرواسیون گروه‌های کربوکسیل از پلی‌ساکارید (GA) با گروه‌های آمینی از پروتئین‌ها (WPI) واکنش داده و گروه‌های آمیدی تشکیل می‌شوند [۵۵]. همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، پیک مربوط به گروه آمینی WPI (دارای بار مثبت) در عدد موجی 3296 cm^{-1} و پیک مربوط به گروه کربوکسیلیک GA (دارای بار منفی) در عدد موجی 2939 cm^{-1} ظاهر شده است. نتایج بررسی طیف‌های FTIR تمامی تیمارها حاکی از تشکیل گروه آمیدی است. پیک موجود در عدد موجی 1621 cm^{-1} ، حاکی از تشکیل گروه آمیدی است. نتایج حاصل از شکل ۵ نشان می‌دهد ورود

۴. نتیجه‌گیری

خشک‌کن پاششی، به دلیل استفاده از دمای بالا و استرس بیشتر نسبت به روش خشک‌کن انجمادی کمتر بود. نتایج حاصل از آزمون تفرق پراش اشعه نشان داد که ذرات خشک شده به روش خشک‌کن پاششی، به دلیل استفاده از دماهای بالاتر و احتمال شکست ساختاری بیشتر در بیوپلیمرها، تعداد و شدت پیک‌ها و در نتیجه درجه بلورینگی کمپلکس کمتر از روش خشک‌کردن انجمادی است؛ به عبارت دیگر، ریزذرات خشک‌شده به روش خشک‌کن انجمادی، دارای ساختار آمورف و ریزذرات خشک‌شده به روش پاششی، دارای ساختار کریستالی بودند و افزودن باکتری، تغییری در ماهیت بلورین این ترکیبات به وجود نیاورد. به طور کلی، ریزپوشانی به روش کواکراسیون می‌تواند باعث افزایش ماندگاری این ترکیبات شود.

امروزه استفاده از ترکیبات زیست‌فعال در مواد غذایی به‌طور چشمگیری در حال افزایش است. از جمله مهم‌ترین این ترکیبات می‌توان به پروبیوتیک‌ها و استرول‌های گیاهی (فیتواسترول) اشاره کرد؛ اما استفاده از این ترکیبات در مواد غذایی با محدودیت‌هایی همراه است که در مورد پروبیوتیک‌ها می‌توان به نرخ کم‌ماندگاری و عدم زنده‌مانی آن‌ها در بدن میزبان و در مورد فیتواسترول‌ها می‌توان به حلالیت پایین و طعم نامطلوب و گچی آن‌ها اشاره کرد. با استفاده از روش ریزپوشانی می‌توان تا حد زیادی بر این دو مشکل فائق آمد. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که ماندگاری باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در حضور فیتواسترول، به دلیل اثر محافظت‌کنندگی فیتواسترول افزایش یافت. همچنین درصد زنده‌مانی این باکتری در روش

منابع

- [1] FAO/WHO (2001). Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, London, Ontario, Canada.
- [2] Wang, K.Y., Li S.N., Liu, C.S., Perng D.S., Su, Y.C., Wu, D.C., Jan C.M., Lai C.H., Wang, T.N., Wang, W.M., (2004) Effects of ingesting *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. The American Journal of Clinical Nutrition, 80:737–741.
- [3] Belviso, S., Giordano, M., Dolci, P., Zeppa, G. (2009) In vitro cholesterol-lowering activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from the Italian Castelmagno PDO cheese. Dairy Sci Technol., 89, 169–176.
- [4] Ibrahim, F., Ruvio, S., Granlund, L., Salminen, S., Viitanen, M., Ouwehand, A., (2010) Probiotics and immunosenescence: cheese as a carrier. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 59, 53–59.
- [5] Agrawal, R., (2005). Probiotics: An emerging food supplement with health benefits. *Food Biotechnology*, 19(3), 227–246.
- [6] Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467–483.
- [7] Ross, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1410–1417.
- [8] Siuta-Cruce, P. J. Goulet. (2001). Improving probiotic survival rates. *Food Technol*, 55: 36–42.
- [9] Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197–215.
- [10] Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., Kim, H. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171–1185.
- [11] Baker, V.A., Hepburn, P., Kennedy, S.J., Jones, P.A., Lea, L.J., Sumpter J.P., Ashby, J. (1999). Safety and evaluation of phytosterol esters. Part 1. Assessment of oestrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Food Chem Toxicol*, 37:13–22.
- [12] Ostlund, RE. (2002). Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Human Nutr* 22:533–549.
- [13] Zawistowski, J., Kitts, D. (2004). Functional foods—a new step in the evolution of food development. *Clin Rounds* 4:1–6.

- [14] Bruce, J., Grattan, Jr., (2013). Plant Sterols as Anticancer Nutrients: Evidence for Their Role in Breast Cancer. *Nutrients*, 5:359-387.
- [15] Bouic, P.J. (2001). The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 4: 471-475.
- [16] McClements, D.J., Decker, E.A., Weiss, J., (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72, 109-124.
- [17] Garg, M.L., Wood, L.G., Singh, H., Moughan, P.J. (2006). Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. *Journal of Food Science*, 71(5), R66-R71.
- [18] Kagami, S., Sugimura, S., Fujishima, N., Matsuda, K., Kometani, T., Matsumura, Y. (2003). Oxidative stability, structure, and physical characteristics of microcapsules formed by spraying drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *Journal of Food Science*, 68, 2248-2255.
- [19] Halwanil, M., Yebiol, B., Suntres, Z.E., Alipour, M., Azghani, A.O., Omri, A. (2008). Coencapsulation of gallium with gentamicin in liposomes enhances antimicrobial activity of gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, 1291-1297.
- [20] Awaisheh, s., Khalifeh, M., Al-Ruwaili, M., A, Khalil O., Al-Ameri, O., Al-Groom, R. (2013). Effect of supplementation of probiotics and phytosterols alone or in combination on serum and hepatic lipid profiles and thyroid hormones of hypercholesterolemic rats. *Journal of Dairy Science*, Vol, 96: 9-15.
- [21] Rabiskova, M., Valaskova, J. (1998). The influence of HLB on the encapsulation of oils by complex coacervation. *Journal of Microencapsulation*, 15(6): 747-751.
- [22] Thies, C. (2007). Microencapsulation of flavors by complex coacervation. In: J.M. Lakkis (Ed.), *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. pp. 148-170.
- [23] Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 14: 737-743.
- [24] Izadi, Z., Nasirpour, A., Garoosi, G.A. (2012). Optimization of phytosterols dispersion in an oil/water emulsion using mixture design approach. *JDST* 33:1715-1722.
- [25] Eratte, D., McKnight, S., Gengenbach, T.R., Dowling, K., Barrow, C.J., Adhikari, B.P. (2015). Co-encapsulation and characterization of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates. *Journal of Functional Foods*, 19, 882-892.
- [26] Razavizadeh, B.B.M., Khan Mohammadi, F., Azizi, S.N. (2014). Comparative study on properties of rice bran oil microcapsules prepared by spray drying and freeze drying. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*, 3(2):97-114.
- [27] Di Battista, C.A., Constenla, D., Ramirez-Rigo, M.V., Pina, Juliana. (2015). the use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying. *Journal of powder technology*, (286). 193-201.
- [28] Awaisheh, S.S., Haddadin, M.Y., Robinson, R.K. (2005). Incorporation of selected nutraceuticals and probiotic bacteria into a fermented milk. *International Dairy Journal*, 15 1184-1191.
- [29] Pedroso, D. L., Thomazini, M., Heinemann, R.B., Favaro-Trindade, C.S. (2012). Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spraychilling. *International Dairy Journal*-Published in Association with the International Dairy Federation, 26(2), 127-132.
- [30] Picot, A., Lacroix, C. (2004). Encapsulation of *bifidobacteria* in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*-Published in Association with the International Dairy Federation, 14(6), 505-515.
- [31] Parsa, P. Alizadeh, M. Rezadad Bari, M and Moghar, A.A.(2015). Optimisation of probiotic yoghurt production enriched with phytosterols. *International Journal of Dairy Technology*, Vol 68, No 4.
- [32] Eratte, D., McKnight, S., Gengenbach, T. R., Dowling, K., Barrow, C. J., Adhikari, B.P. (2015). Co-encapsulation and characterization of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates. *Journal of Functional Foods*, 19, 882-892.
- [33] Gardiner, G. E., O'Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., Ross, R. P., Stanton, C. (2000). Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2605-2612.
- [34] Chandramoulia, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 27-35.

- [35] Tavakol, M., Vasheghani-Farahani, E., Dolatabadi-Farahani, T., Hashemi-Najafabadi, S. (2009). Sulfasalazine release from alginate-N,O-carboxymethyl chitosan gel beads coated by chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 326–330.
- [36] Sadat Vaziri, A., Alemzadeh, I., Vossoughi, M and Chackoshian Khorasani, A. (2018). Co-microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* and DHA fatty acid in alginate-pectin-gelatin biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 199, 266-275.
- [37] Quispe-Condori, S., Saldaña M.D.A., Temelli, F. (2011). Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1880–1887.
- [38] Choi, M., Ruktanonchai, U., Min, S., Chun, b., Soottitantawat, A. (2010). Physical characteristics of fish oil encapsulated by β -cyclodextrin using an aggregation method or polycaprolactone using an emulsion–diffusion method. *Journal of Food Chemistry*, 119, 1694–1703.
- [39] Mukai-Corrêa, R., Prata, A.S., Grosso, C.R.F. (2003). Microcapsules obtained by ionic polymerization. In Release of casein encapsulated in alginate and pectin. *Aquaculture*, 2.
- [40] Ghanbarzadeh, B., Almasi, H and Niknia, N. (2012). Chemistry and physic of food colloidal systems and biopolymer solution, Volume 1. Publication Sanati Sharif University. (In Persian)
- [41] Caparino, O.A., Tang, J., Nindo, C.I., Sablani, S.S., Powers, J.R., Fellman, J.K. (2012). Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine ‘Carabao’ var.) powder. *Journal of Food Engineering*, 111 135–148.
- [42] Botrel, D. A., de Barros Fernandes, R. V., Borges, S. V., Yoshida, M. I. (2014). Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. *Food Research International*, 62(0), 344–352.
- [43] Walton, D. E. (2000). The morphology of Spray-Dried particles a qualitative view. *Drying Technology*, 18(9), 1943-1986.
- [44] Haque, M.K., Roos, Y.H., (2006). Differences in the physical state and thermal behavior of spray-dried and freeze-dried lactose and lactose-protein mixtures. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7(1), 62-73.
- [45] Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616–622.
- [46] Ying, D., Schwander, S., Weerakkody, R., Sanguansri, L., Gantenbein-Demarchi, C., Augustin, M.A. (2013). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 98–105.
- [47] Rosenberg, M., Kopelman, I. J., Talmon, Y. (1985). A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *Journal of Food Science*, 50, 139–144.
- [48] Sheu, T. Y., Rosenberg, M. (1998). Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. *Journal of Food Science*, 63(3), 491–494.
- [49] Smrdel, P., Bogataj, M., Zega, A., Planinsek, O., Mrhar, A. (2008). Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. *Journal of Microencapsulation*, 25(2), 90-105.
- [50] Sarblooki, M. 1995. Practical of Organic Chemistry, Publication of Jihad.
- [51] Yang, F., Oyeyinka, SA., Ma Y. (2016). Novel Synthesis of Phytosterol Ester from Soybean Sterol and Acetic Anhydride. *Journal of Food science*.81 (7). 1629-1635.
- [52] Da Silva, H.R. Quintella, C. M. and Meira, M. (2017). Separation and Identification of Functional Groups of Molecules Responsible for Fluorescence of Biodiesel Using FTIR Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Journal of Brazilian Chemistry Society*. Vol. 28, No. 12, 2348-2356.
- [53] Rajam, R Anandharamakrishnan, C. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *Journal of food research international*, (66).454-462.
- [54] Daoub, R.M.A., Elmubarak, A.H., Misran, M. Hassan, E. A., Osman, M.E. (2016). Characterization and functional properties of some natural Acacia gums. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. Vol. 17, 241-249.
- [55] Santos, M.G., Bozza, F.T., Thomazini, M., Favaro-Trindade, C.S., (2015) Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex Coacervation. *Journal of Food Chemistry*, 171, 32-39

*Research Article***Investigation of lactobacillus plantarum and phytosterol co- encapsulation by complex coacervation****SohrabSharifi^{1,2}, Mahmoud Rezazadeh Bari^{3*}, Mohammad Alizadeh³ and Hadi Almasi⁴****1. Vice chancellor for Food and Drug, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran****2. PhD, Department of Food Science and Technology, Agriculture Faculty, Urmia University, Urmia, Iran****3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran****4. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran****Abstract**

Co-encapsulation of more than one core material in a single encapsulation system may increase the bioactivity of individual components. Whey protein isolate (WPI) and Gum Arabic (GA) were used as wall material to encapsulate probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* (P) alone or in combination with phytosterol (Ph) by complex coacervation method. The liquid microcapsules WPI-P-GA and WPI-P-Ph-GA were transferred to the powder using spray and freeze-drying to produce solid microcapsules. Results showed that the cell viability of *L.plantarum* in both liquid and dried microcapsules (freeze and spray drying) were much better in the presence of phytosterol (WPI-P-Ph-GA) than the absence of it (WP-Ph-GA) and the viability of *L.plantarum* in spray-dried solid microcapsules was better in comparison to the freeze-dried microcapsules during the storage time (60 days). Encapsulation efficiency in spray dryer was significantly ($p > 0.05$) higher than freeze dryer. The microcapsules were characterized in terms of Size, Zeta Potential, and poly dispersity index (PDI). The particle size of WPI-GA and WPI-Ph-GA were 196.2 ± 13.72 and 366.5 ± 0.56 nm respectively. Electrostatic interaction and formation of coacervates were confirmed by Fourier Transform Infra-Red (FTIR) spectra. Scanning electron microscopy (SEM) analysis showed that microcapsules dried by freeze dryer had a porous morphology and did not have any particular shape but microcapsules that dried by spray dryer showed the quasi-spherical configuration and had a wrinkled surface. X-ray pattern of co-microencapsulated identified that microcapsules dried by freeze-dryer had an amorphous structure compared to spray-dried ones.

Keywords: Encapsulation, Lactobacillus plantarum, phytosterol, coacervation.

* Corresponding author: m.rezazadehbari@urmia.ac.ir