

Microencapsulation of Fish Oil Omega-3 Fatty Acids and Lactiplantibacillus plantarum by Coacervation

Ali Jafarpour¹,
Elahé Sharifi²,
Mojtaba Najafi³,
Alireza Rafiei⁴,
Zahra Hosseinkhah⁵

¹ Associate Professor, Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

² PhD Student in Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar University of Maritime and Marine Sciences, Chabahar, Iran

³ Assistant Professor, Department of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

⁴ Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Assistant Professor, Diabetes Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 21, 2021 ; Accepted September 11, 2022)

Abstract

Background and purpose: In the present study, Micro-capsulated fish oil omega-3 fatty acids and *Lactobacillus Plantarum* produced by electrostatic interaction coacervation was investigated in three biopolymer formulations.

Materials and methods: Three biopolymer formulations of fish gelatin-gum Arabic, fish gelatin-chitosan, and gum Arabic-gelatin were used to study the effect of wall materials. Also, we investigated the effect of wall-to-core materials ratio at 2: 1, 3: 1, and 4: 1 and homogenizer speeds of 3500 and 7000 rpm.

Results: The results of the microencapsulation efficiency of omega-3 fatty acids showed that treatment 12 had the highest yield (96.26 ± 0.19). It contained a biopolymer mixture containing gelatin-chitosan which surrounded a high percentage of omega-3, while the amount of omega-3 on the surface of the capsule was very low. Also, treatment 6 containing gelatin wall materials and gum Arabic had a high ability to surround bacteria and compared to free bacteria, the bacterial mortality rate was lower when exposed to simulated gastric conditions. In addition, after being in the simulated intestinal condition, the number of bacteria increased after 120 minutes that shows the capsule has released its compounds in alkaline conditions of the intestine.

Conclusion: This study showed that using the combined coacervation technique using fish gelatin biopolymers, chitosan, and gum Arabic as wall materials, can produce omega-3 capsules and *Lactobacillus Plantarum* in micrometer sizes. They can play a protective role in preventing the oxidation of probiotic and omega-3 bacteria.

Keywords: microencapsulation, omega-3 fatty acids, *Lactobacillus plantarum*, coacervation

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (214): 77-89 (Persian).

Corresponding Author: Zahra Hosseinkhah - Diabetes Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: zahra_582005@yahoo.com)

میکروکپسولاسیون اسیدهای چرب امگا-3 روغن ماهی به همراه باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم به روش کواسرواسیون

علی جعفرپور¹
الهه شریفی²
مجتبی نجفی³
علیرضا رفیعی⁴
زهرا حسینی خواه⁵

چکیده

سابقه و هدف: در این مطالعه، میکروکپسولاسیون اسیدهای چرب امگا-3 به همراه باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم در کوآسروای حاصل از برهمکنش الکترواستاتیک در سه فرمولاسیون بیوپلیمری مورد ارزیابی قرار گرفت. **مواد و روش‌ها:** به منظور بررسی تأثیر جنس دیواره از سه فرمولاسیون ژلاتین- صمغ عربی، ژلاتین- کیتوزان و صمغ عربی- کیتوزان استفاده شد، هم‌چنین تأثیر نسبت مواد دیواره به هسته در سه سطح 1:2، 1:3 و 1:4 و دور هم‌وزن‌ایزر در دو سطح 3500 و 7000 rpm بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تیمار 12، بالاترین مقدار بازدهی ($96/26 \pm 0/19$) را دارد که در آن مخلوط بیوپلیمر که حاوی ژلاتین-کیتوزان بود، درصد بالایی از امگا-3 را احاطه کرده در حالی که مقدار امگا-3 که در سطح کپسول حضور دارد، بسیار کم است. تیمار 6 که حاوی مواد دیواره ژلاتین و صمغ عربی بود، قابلیت بالایی برای احاطه باکتری دارد و در مقایسه با باکتری‌های آزاد هنگامی که در شرایط شبیه سازی شده معده قرار گرفت نرخ مرگ و میر باکتری در آن کم‌تر بود. به علاوه بعد از قرار گرفتن در شرایط شبیه سازی شده روده تعداد باکتری‌ها بعد از گذشت 120 دقیقه افزایش یافت که این امر نشان می‌دهد کپسول در شرایط قلبایی روده به خوبی ترکیبات خود را آزاد کرده است.

استنتاج: در نتیجه، استفاده از تکنیک کوآسرواسیون مرکب با استفاده از بیوپلیمرهای ژلاتین ماهی، کیتوزان و صمغ عربی به عنوان مواد دیواره، می‌تواند کپسول‌های حاوی امگا-3 و باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در اندازه‌های میکرومتری تولید کند و می‌تواند نقش محافظتی برای جلوگیری از اکسیداسیون این ترکیبات داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: میکروکپسولاسیون، اسیدهای چرب امگا 3، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، روش کواسرواسیون

مقدمه

کاهش خطر بیماری‌های قلبی عروقی، برخی از انواع سرطان‌ها و هم‌چنین نقش کلیدی در رشد مغز ایفا می‌کنند، با این حال، با توجه به ماهیت غیراشباع آن‌ها بسیار حساس به اکسیداسیون لپیدی هستند (2).

یکی از این ترکیبات کاربردی در صنایع غذایی اسیدهای چرب غیراشباع امگا-3 است. اسیدهای چرب غیراشباع امگا-3 و امگا-6 برای عملکرد فیزیولوژیکی بدن دارای اهمیت زیادی هستند (1) و نقش مهمی در

E-mail: zahra_582005@yahoo.com

مؤلف مسئول: زهرا حسینی خواه - ساری: مرکز آموزشی درمانی امام خمینی، مرکز تحقیقات دیابت

1. دانشیار، گروه شیلات، دانشکده علوم دام و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

2. دانشجوی دکتری شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

3. استادیار، گروه ژنتیک و اصلاح نژاد، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران

4. استاد، گروه ایمنولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

5. استادیار، مرکز تحقیقات دیابت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1400/8/30 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/1/23 تاریخ تصویب: 1401/6/20

گزارش شده است که اسیدهای چرب امگا-3 کمک می کنند که باکتری های پروبیوتیک به سطح روده متصل شوند (12، 13). هم چنین حضور اسیدهای چرب امگا-3 در میکروکپسول های حاوی باکتری پروبیوتیک میزان زنده ماننی این باکتری ها را افزایش می دهد (14). با توجه به نتایج مطالعات قبل مبنی بر تاثیر گذاری باکتری های پروبیوتیک، اسیدهای چرب امگا-3 و هم چنین اثر افزایش میزان زنده ماننی این باکتری ها در حضور اسیدهای چرب، برای اولین بار میکروکپسولاسیون باکتری های پروبیوتیک و اسیدهای چرب مورد بررسی قرار گرفت تا در مطالعات آتی میزان اثر گذاری این ترکیب در سلول های سرطانی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر در مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران (کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1397.318) و آزمایشگاه گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شده است. باکتری لاکتوباسیلوس پلانٹاروم از مرکز کلکسیون باکتری و قارچ ایران (پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران) تهیه شد. مکمل امگا-3 حاوی 380 میلی گرم دکوزاهگزانوئیک اسید و 460 میلی گرم ایکوزاپنتانوئیک اسید (شرکت سازنده Pronova Biopharma Norge)، ژلاتین ماهی و کیتوزان از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا و صمغ عربی از شرکت دای جونگ (کره جنوبی) خریداری شد. سایر مواد آزمایشگاهی نیز از شرکت مرک آلمان فراهم شد.

کشت باکتری لاکتوباسیلوس پلانٹاروم

باکتری لاکتوباسیلوس پلانٹاروم در محیط MRS broth استریل کشت داده شد و به مدت 48 ساعت در انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس با دور 2200rpm به مدت 15 دقیقه در دمای

در طی فرآیند اکسیداسیون اسیدهای چرب امگا-3، پراکسید تولید می شود که در ادامه به ترکیبات فرار تبدیل شده که برخی از آنها طعم نامطلوب تولید می کنند و در نهایت موجب کاهش ارزش تغذیه ای اسیدهای چرب امگا-3 می شوند (3). بنابراین، ارائه راهکارهای مناسب برای افزایش ماندگاری روغن ماهی حاوی اسیدهای چرب غیراشباع برای استفاده آن در صنایع غذایی ضروری است (4). از روش های معمول برای حفاظت از روغن ماهی در مقابل اکسیداسیون، اضافه کردن آنتی اکسیدان و تکنیک ریزپوشانی است (5).

پروبیوتیک ها میکروارگانیزم های زنده ای هستند که اثرات سلامتی بخش در میزبان بر جای می گذارند. فعالیت و زنده ماندن پروبیوتیک ها به هنگام رسیدن به روده شرط لازم برای بروز اثرات سلامتی بخش است (6). باکتری های اسیدلاکتیک مهمترین باکتری های پروبیوتیک هستند که اثرات سودمندی روی میزبان خود دارند. لاکتوباسیلوس پلانٹاروم یک باکتری پروبیوتیک، گرم مثبت، هتروفرومنتاتیو، میله ای، غیر اسپورزا، غیر متحرک و تولید کننده اسیدلاکتیک می باشد (7). بر حسب استانداردها، برای بروز ویژگی های سلامتی بخش پروبیوتیک ها باید به تعداد 10^6 cfu/gr تا 10^7 cfu/gr از محصول پروبیوتیک وجود داشته باشد. مانع اصلی برای حفظ این سطوح پیشنهادی، قابلیت زنده ماننی ناچیز ناشی از تنش اسیدیته و اکسیژن توسعه یافته و نقصان مواد غذایی می باشد (8). علاوه بر این pH بسیار پایین معده، هم چنین حضور نمک های صفراوی در روده، دلایل اصلی کاهش ناگهانی در قابلیت زیستی سلول های انتقال یافته است. از این رو بررسی زنده ماننی باکتری های پروبیوتیک در مسیر دستگاه گوارش از اهمیت زیادی برخوردار است (9، 10). جهت غلبه بر این مشکلات، شیوه های مختلفی شامل کشت های میکروبی؛ افزودن پری بیوتیک ها و تکنیک میکروکپسوله کردن وجود دارد (11). اثر سینرژیک بین اسید چرب امگا-3 و باکتری های پروبیوتیک در طول هضم به این صورت

4 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ و رسوب باکتری با سرم فیزیولوژی استریل دوبار شستشو داده شد. سوسپانسیون حاصله به کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند با غلظت $2/4 \times 10^9$ تنظیم شدند.

فرآیند میکروکپسولاسیون

در این مطالعه 18 حالت متفاوت میکروکپسولاسیون بررسی شد. مواد دیواره بر اساس سه چیدمان (ژلاتین ماهی - صمغ عربی، ژلاتین ماهی - کیتوزان، کیتوزان - صمغ عربی) طراحی شدند. محلول‌های ذخیره ژلاتین و صمغ عربی با غلظت 6 درصد و کیتوزان با غلظت یک درصد وزنی - وزنی (در محلول یک درصد اسید استیک گلاسیال) تهیه شدند. به منظور هیدراته شدن کامل بیوپلیمرها عمل هم‌زدن دیسپرسیون ژلاتین و صمغ عربی به ترتیب در دمای 50 و 25 درجه سانتی گراد به مدت 18 ساعت و کیتوزان در دمای 65 درجه سانتی گراد به مدت 2 ساعت در بن ماری انجام گرفت. هم‌چنین نسبت اسیدهای چرب امگا-3 به باکتری لاکتوباسیلوس پلاتناروم به صورت ثابت 1:1 در نظر گرفته شد و میکروکپسول‌ها بر اساس نسبت 1:2، 1:3 و 1:4 مواد هسته به مواد دیواره آماده شدند. تمامی امولسیون‌ها با دور rpm 7000 و 3500 آماده شدند. به منظور خشک کردن امولسیون‌ها و دستیابی به پودر خشک، از خشک‌کن انجمادی استفاده شد.

آزمایش‌های انجام شده روی امولسیون‌ها

اندازه‌گیری روغن سطحی

برای اندازه‌گیری روغن سطحی یا آزاد، 15 میلی‌لیتر هگزان به 2/5 گرم پودر اضافه و به مدت 2 دقیقه ورتکس شد، سپس به مدت 20 دقیقه در 8000 rpm سانتریفیوژ شد. محلول رویی فیلتر و کاغذ صافی 2 بار با هگزان شسته شد. هگزان توسط روتاری با دمای 70 درجه سانتی‌گراد تبخیر شد و روغن باقی‌مانده در 105 درجه سانتی‌گراد خشک شد و روغن آزاد محاسبه شد (15).

اندازه‌گیری روغن ریزپوشانی شده

به منظور اندازه‌گیری روغن کپسوله شده، پودر عاری از چربی سطحی (پودر حاصل از مرحله قبل) با 2 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت 1 دقیقه ورتکس شد. محلول حاصل با 25 میلی‌لیتر از هگزان/ایزوپروپانول (1:3) استخراج شد و سپس به مدت 20 دقیقه در 4000 rpm سانتریفیوژ شد. فاز آلی شفاف جمع‌آوری شد و دوباره فاز آبی با مخلوط حلال استخراج شد. در نهایت این محلول حاوی روغن کپسوله شده در آن با دمای 105 درجه سانتی‌گراد تبخیر شد و مقدار روغن باقی‌مانده محاسبه شد (15).

بازدهی میکروکپسولاسیون از رابطه زیر محاسبه شد (15):

$$EE = \frac{\left(\frac{gr}{100 gr}\right) \text{ Encapsulation Oil}}{\left(\frac{gr}{100 gr}\right) \text{ Total}} * 100$$

روغن کل مجموع روغن کپسوله شده و روغن سطحی است.

شمارش تعداد باکتری‌های به دام افتاده در میکروکپسول‌ها 1 گرم از نمونه‌های میکروکپسوله شده را در 99 ml محلول 1 درصد وزنی - حجمی سدیم سیترات استریل در pH حدود 7/2 پراکنده نموده و به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق هم‌زده تا میکروکپسول‌ها به‌طور کامل حل و باکتری‌ها آزاد شوند، آنگاه با استفاده از محیط کشت MRS agar در شرایط بی‌هوازی، دمای 37 درجه سانتی‌گراد و به مدت 48 ساعت گرمخانه‌گذاری شد و سپس تعداد باکتری‌ها در 3 تکرار شمارش شد.

بررسی زنده‌مانی باکتری‌های میکروکپسوله شده در شرایط شبیه‌سازی شده شیره معده و روده

شرایط شبیه‌سازی شده شیره معده، مطابق با روش Miyashita و همکاران انجام گرفت (3). بدین گونه که پپسین با محلول سدیم کلراید 0/5 درصد تا رسیدن به غلظت 3 گرم در لیتر مخلوط شد و سپس pH آن به

چسب‌ها از یک طرف به سطح نمونه‌گیر واسطه و از طرف دیگر با پودر تماس داده می‌شوند. برای پراکنده‌سازی خوب پودرها از روش اولتراسونیک استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

مطالعه حاضر به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل اجرا شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه و دو طرفه با کمک نرم‌افزار SPSS استفاده شد. برای بررسی سطح معنی‌دار اختلافات بین گروه‌ها، از آزمون دانکن استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بازدهی میکروکپسول‌های تولید شده

داده‌های حاصل از اندازه‌گیری بازدهی‌ها در جدول شماره 1 آورده شده است. طبق نتایج، بازدهی پودرهای تولیدشده بین $58/98 \pm 0/41$ تا $96/26 \pm 0/19$ در تیمارهای مختلف متفاوت است. بالاترین سطح بازدهی به تیمار $12 (96/26 \pm 0/19)$ مربوط می‌شود که در این تیمار با جنس دیواره ژلاتین - کیتوزان مقدار زیادی از روغن توسط بیوپلیمر کل احاطه شده است. هم‌چنین کم‌ترین سطح بازدهی به تیمار $2 (58/98 \pm 0/41)$ مربوط می‌شود که حاوی بیش‌ترین مقدار روغن سطحی است.

اثرات جداگانه و توأم پارامترهای مورد آزمایش روی سه شاخص روغن سطحی، روغن کپسوله شده و بازدهی میکروکپسولاسیون در جداول شماره 2 و 3 بیان شده است. براساس مقادیر P شاخص روغن سطحی، روغن کپسوله شده و بازدهی میکروکپسولاسیون تحت تأثیر هر سه پارامتر هستند و در مجموع جنس دیواره بیش‌ترین تأثیر را بر میزان تغییرات بازدهی میکروکپسولاسیون دارد. نتایج نشان می‌دهد کپسول‌های تولید شده با مواد دیواره ژلاتین و کیتوزان از بازدهی بالاتری برخوردار بوده‌اند. هم‌چنین با افزایش نسبت مواد دیواره به هسته میزان روغن سطحی کاهش یافته و میزان بازدهی افزایش یافته است.

وسيله اسيد كلريدريك استريل (0/1 مولار) به 2/5 رسانده شد، محلول حاصل به وسيله ميكروفيلتر 0/45 ميكرومتر استريل شد. شرايط شبیه‌سازی شده شیره روده مطابق روش Charteris و همکاران انجام گرفت (16). بدین ترتیب که، پانکراتین با سدیم کلرید 0/5 درصد تا رسیدن به غلظت نهایی 1 گرم در لیتر با 4/5 درصد محلول نمک‌های صفاوی (Oxoid, Basingstoke UK) مخلوط شد، سپس pH آن با محلول سود 0/1 مولار استريل به حدود 7/4 رسانده شد، محلول حاصل با فیلتراسیون به وسیله میکروفیلتر 0/45 میکرومتر استريل شد. مقدار یک گرم از میکروکپسول‌ها همراه با 1 ml از سوسپانسیون باکتری‌های آزاد داخل تیوب‌های حاوی 9 ml از شیره معده ریخته شد و برای مدت 2 ساعت در دمای 22 درجه سانتی‌گراد در حال هم‌زدن قرار گرفت. سپس به تیوبی که حاوی 10 ml محیط شبیه‌سازی شده روده بود انتقال داده شد و 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در طی این مدت، در فواصل زمانی صفر، 60، 120 دقیقه تعداد باکتری‌ها در میکروکپسول‌ها و باکتری‌های آزاد با استفاده از روش رقیق‌سازی توسط پیتون واتر، در محیط MRS Agar کشت داده شد و تعداد کلونی‌های تشکیل شده بعد از 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با سه تکرار برای هر نمونه شمارش شد (17).

فعالیت آبی پودر میکروکپسول‌ها

فعالیت آبی پودر کپسول‌های تولید شده با دستگاه Water activity meter اندازه‌گیری شد. 2 گرم پودر در پلیت مخصوص دستگاه ریخته شد سپس پلیت در دستگاه قرار گرفت و مقدار فعالیت آبی به صورت عدد خوانده شد.

مورفولوژی سطح میکروکپسول‌ها

بررسی ریزساختار و مورفولوژی سطحی پودرهای تولیدی به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. نمونه‌سازی با پودر معمولاً با استفاده از چسب‌های دو طرفه انجام می‌گیرد. این

جدول شماره 1: میانگین مقادیر اندازه گیری شده روغن سطحی، روغن کپسوله شده، بازدهی و فعالیت آبی میکروکپسولهای تولید شده

نیمار	پلیمر	هسته: دیواره	دور هموزنایزر	روغن سطحی (gr/100 gr)	روغن کپسوله شده (gr/100 gr)	بازدهی ریزپوشانی (درصد)	فعالیت آبی
1	ژلاتین صمغ عربی	1:2	3500	9/0±95/05	51/0±21/09	83/0±73/06	0/±17/01
2	ژلاتین صمغ عربی	1:2	7000	30/0±35/56	43/0±64/09	58/0±98/41	0/0±08/004
3	ژلاتین صمغ عربی	1:3	3500	23/0±55/39	40/0±73/1	63/0±36/34	0/0±36/01
4	ژلاتین صمغ عربی	1:3	7000	15/0±63/3	34/82±0/08	69/0±02/45	0/0±44/02
5	ژلاتین صمغ عربی	1:4	3500	8/0±04/11	40/0±51/07	83/0±43/18	0/0±08/003
6	ژلاتین صمغ عربی	1:4	7000	7 0±/08	41/0±58/09	85/0±58/12	0/0±09/004
7	ژلاتین - کیتوزان	1:2	3500	20/0±98/2	48/0±42/08	69/0±79/24	0/0±13/004
8	ژلاتین - کیتوزان	1:2	7000	18/0±45/13	51/0±57/17	73/0±65/09	0/0±11/005
9	ژلاتین - کیتوزان	1:3	3500	13/0±9/09	45/15±0/94	76/0±45/26	0/0±09/001
10	ژلاتین - کیتوزان	1:3	7000	6/0±54/15	57/0±73/29	89/0±83/26	0/0±07/002
11	ژلاتین - کیتوزان	1:4	3500	2/0±93/13	56/0±54/12	95/0±06/2	0/0±06/007
12	ژلاتین - کیتوزان	1:4	7000	2/0±26/12	58/0±4/06	96/0±26/19	0/0±12/007
13	صمغ عربی - کیتوزان	1:2	3500	28/0±74/18	48/0±44/09	62/0±76/19	0/0±12/003
14	صمغ عربی - کیتوزان	1:2	7000	12/0±76/12	62/0±27/16	0±83/1	0/0±08/02
15	صمغ عربی - کیتوزان	1:3	3500	13/0±62/1	53/0±81/15	79/0±79/07	0/0±09/003
16	صمغ عربی - کیتوزان	1:3	7000	4/0±86/11	0±57/08	92/0±1/17	0/0±01/002
17	صمغ عربی - کیتوزان	1:4	3500	12/0±55/42	59/0±54/16	82/0±59/52	0/0±07/003
18	صمغ عربی - کیتوزان	1:4	7000	10/0±71/17	104/0±59/18	90/0±70/15	0/0±08/002

جدول شماره 2: آنالیز واریانس چند متغیره روغن سطحی، روغن کپسوله شده، بازدهی و فعالیت آبی میکروکپسولها

شاخص	پارامتر	درجه آزادی	مقدار F	سطح معنی داری
روغن سطحی	جنس دیواره	2	2/028	< 0/001
	دور هموزنایزر	1	2/021	< 0/001
	نسبت دیواره به هسته	2	1/392	< 0/001
	جنس دیواره × دور هموزنایزر × نسبت دیواره به هسته	12	2/485	< 0/001
خطا				
روغن کپسوله شده	جنس دیواره	2	3/320	< 0/001
	دور هموزنایزر	1	1/129	< 0/001
	نسبت دیواره به هسته	2	1/064	< 0/001
	جنس دیواره × دور هموزنایزر × نسبت دیواره به هسته	12	6/104	< 0/001
خطا				
بازدهی ریزپوشانی	جنس دیواره	2	6/932	< 0/001
	دور هموزنایزر	1	4/464	< 0/001
	نسبت دیواره به هسته	2	1/981	< 0/001
	جنس دیواره × دور هموزنایزر × نسبت دیواره به هسته	12	3/492	< 0/001
خطا				
فعالیت آبی	جنس دیواره	2	1/012	< 0/001
	دور هموزنایزر	1	2/021	1
	نسبت دیواره به هسته	2	783/525	< 0/001
	جنس دیواره × دور هموزنایزر × نسبت دیواره به هسته	12	301/212	< 0/001
خطا				

جدول شماره 3: بررسی اثرات جداگانه و توأم تیمارهای مورد آزمون بر پارامترهای روغن سطحی، روغن کپسوله شده، بازدهی و فعالیت آبی میکروکپسولها

پارامتر	روغن سطحی	روغن کپسوله شده	بازدهی ریزپوشانی	فعالیت آبی
جنس دیواره	ژلاتین - صمغ عربی	15/75± 8/85 ^a	42/08± 5/02 ^c	74/02± 10/96 ^e
	ژلاتین - کیتوزان	10/84± 7/56 ^c	52/97± 5/13 ^b	83/50± 10/89 ^d
	صمغ عربی - کیتوزان	13/87± 7/46 ^b	64/27± 19/08 ^a	81/83± 3/63 ^d
نسبت دیواره به هسته	2:1	20/20± 7/75 ^a	50/93± 5/86 ^b	71/98± 9/59 ^c
	3:1	13/01± 6/33 ^b	48/21± 8/85 ^c	78/43± 10/62 ^d
	4:1	7/25± 3/86 ^c	60/79± 21/91 ^a	88/94± 5/58 ^e

حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی داری بین میانگین ها است.

نتایج اندازه گیری فعالیت آبی میکروکپسولهای

فعالیت آبی میکروکپسولهای تولید شده

نرخ زنده‌مانی باکتری در شرایط شبیه سازی شده معده و روده زنده ماننی باکتری به صورت میکروکپسوله شده و به صورت آزاد بعد از قرار گرفتن در شرایط شبیه سازی شده معده و روده در طول 120 دقیقه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (جدول شماره 6).

مورفولوژی سطح میکروکپسول ها

مورفولوژی سطح نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. تصویر شماره 1، تصاویر میکروسکوپی پودرهای خشک شده با خشک کن انجمادی را نشان می‌دهد.

جدول شماره 4: شمارش تعداد باکتری‌های به دام افتاده در کپسول‌ها

تیمار	پلیمر	کفونی باکتری
6	ژلاتین- صمغ عربی	$6/37 \times 10^6 \pm 0/02^a$
12	ژلاتین- کیتوزان	$7/5 \cdot 0 \pm 10^7/19^b$
18	صمغ عربی- کیتوزان	$1/88 \times 10^4 \pm 0/001^b$

حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌داری بین میانگین‌ها است.

جدول شماره 5: آنالیز واریانس یک طرفه باکتری‌های به دام افتاده در کپسول

شاخص	پارامتر	درجه آزادی	مقدار F	سطح معنی‌داری
باکتری کپسول شده	جنس دیواره	2	1/919	< 0/001

جدول شماره 6: تعداد (cfu/g) باکتری‌های زنده‌مانده لاکتوباسیلوس پلاتناروم آزاد و میکروکپسوله شده در شرایط شبیه سازی شده معده و روده در توالی‌های زمانی مختلف در دمای 37 درجه سانتی‌گراد

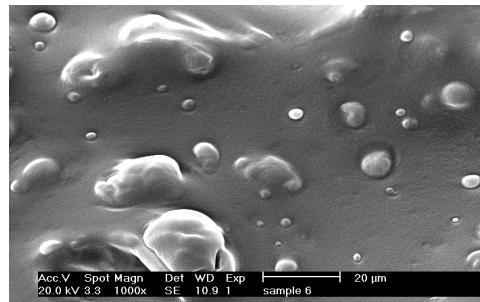
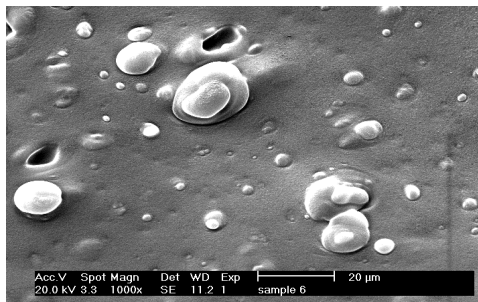
تیمار	بیوپلیمر	0 دقیقه	60 دقیقه	120 دقیقه
شاهد	آزاد	$9/3 \times 10^7/0/05^a$	$4/9 \times 10^7/0/7^b$	$3/9 \times 10^7/0/5^c$
6	ژلاتین- صمغ عربی	$0/39 \times 10^7/0/003^c$	$1/3 \times 10^7/0/1^b$	$2/1 \times 10^7/0/4^a$
12	ژلاتین- کیتوزان	$1 \times 10^7/0/007^a$	$0/041 \times 10^7/0/0007^b$	$0/012 \times 10^7/0/0003^c$
18	صمغ عربی- کیتوزان	$1/8 \times 10^7/0/03^a$	$0/028 \times 10^7/0/0003^b$	$0/033 \times 10^7/0/001^c$

حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌داری بین میانگین‌ها است.

تولید شده در جدول شماره 1 آورده شده است. فعالیت آبی بین $0/01 \pm 0/002$ تا $0/44 \pm 0/02$ در تیمارهای مختلف متفاوت است. بالاترین میزان فعالیت آبی به تیمار 4 با جنس دیواره ژلاتین- صمغ عربی مربوط می‌شود. هم‌چنین کم‌ترین سطح فعالیت آبی به تیمار 16 با جنس دیواره صمغ عربی- کیتوزان مربوط می‌شود. به‌منظور بررسی اثرات جداگانه و توأم تیمارهای مورد آزمایش بر پارامتر فعالیت آبی از آزمون چند متغیره استفاده شد که نتایج آن در جدول‌های 2 و 3 بیان شده است. با افزایش میزان دیواره نسبت به هسته فعالیت آبی پودرها کاهش یافت. قابل ذکر است که تأثیر توأم جنس دیواره، نسبت هسته به دیواره و دور هم‌وزن‌نایز نیز معنی‌دار است. میزان فعالیت آبی در کپسول‌هایی که حاوی کیتوزان هستند اختلاف معنی‌داری ندارند.

تعداد باکتری‌های به دام افتاده در کپسول‌ها

تعداد اولیه باکتری‌های زنده قبل از میکروکپسولاسیون، $2/4 \times 10^8$ CFU/mL محاسبه شد. از بین 18 تیمار، 3 تیمار که از نظر جنس دیواره متفاوت بودند و دارای بالاترین مقدار بازدهی بودند، انتخاب شدند و تعداد باکتری‌های میکروکپسولاسیون شده در آن‌ها بررسی شد (جدول شماره 4 و 5). بر حسب نتایج به‌دست آمده تعداد $6/37 \times 10^6 \pm 0/02$ تا $0/001 \pm 1/88 \times 10^3$ باکتری در این سه تیمار کپسوله شد که بیش‌ترین مقدار باکتری توسط دیواره ژلاتین و صمغ عربی میکروکپسوله شده بود اما بین کپسول‌های با جنس دیواره ژلاتین- کیتوزان و صمغ عربی- کیتوزان اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول شماره 4).



تصویر شماره 1: تصاویر SEM مربوط به تیمار شماره 6 حاوی مواد دیواره ژلاتین-صمغ عربی

بحث

استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک در زمینه‌های مختلف در حال افزایش می‌باشد. با این حال هنوز نیاز به مطالعات زیادی در این مورد می‌باشد تا محدودیت‌های آن مانند نرخ ماندگاری پایین و عدم زنده‌مانی آن‌ها در بدن میزبان برطرف شود. مطالعات متعددی فاکتورهای موثر بر بازدهی و ماندگاری میکروکپسوله‌ها را مورد بررسی قرار دادند و از ترکیبات مختلف برای تکنیک میکروکپسولاسیون استفاده کردند (18-22). بیوپلیمرهای کیتوزان و ژلاتین، از جمله پلیمرهایی هستند که می‌توان برای تولید آن‌ها، از ضایعات کارخانجات فرآوری آبریان استفاده کرد. با توجه به پتانسیل بالقوه ایران در این زمینه (پوست و استخوان‌های ماهی، میگو و خرچنگ) و اهمیت روز افزون این ترکیبات در صنایع غذایی، پزشکی و داروسازی، نیاز به ایجاد بستر برای تولید آن‌ها به صورت تجاری احساس می‌شود. مطالعات قبلی نشان دادند که بازدهی میکروکپسولاسیون تحت تاثیر اثرات جداگانه و توأم پارامترهای مورد آزمایش روی شاخص روغن سطحی، روغن کپسوله شده می‌باشد.

حضور روغن در سطح ذرات پودر، نامطلوب‌ترین ویژگی پودرهای کپسوله شده است (23). روغن سطحی به دلیل حضور در سطح بیرونی کپسول و تماس مستقیم با اکسیژن مستعد اکسیداسیون است بنابراین مقدار آن باید بسیار اندک باشد (24). طبق نتایج مطالعه حاضر، مقادیر روغن سطحی در 18 تیمار بین $2/26 \pm 0/12$ تا $30/35 \pm 0/56$ قرار داشت. با افزایش نسبت مواد دیواره به هسته میزان روغن سطحی کاهش یافت. این نتایج با یافته‌های مطالعه Kolanowski و همکاران که توانایی سلولزهای اصلاح‌شده و مالتودکسترین را به عنوان عوامل میکروکپسوله کننده روغن ماهی بررسی کردند مطابقت دارد. آن‌ها ادعان داشتند که افزایش درصد هسته نسبت به دیواره در امولسیون باعث افزایش روغن سطحی می‌شود (25).

هم‌چنین جعفرپور و همکاران، گزارش کردند با افزایش غلظت امگا-3 از 10 به 30 درصد مقادیر روغن سطحی افزایش یافت. بازدهی میکروکپسول‌ها در مطالعه حاضر، از $58/98 \pm 0/41$ تا $96/26 \pm 0/19$ در تیمارهای مختلف، متفاوت بود و با افزایش نسبت دیواره به هسته میزان روغن کپسوله شده افزایش و به نسبت آن بازدهی هم افزایش یافته است. در تیمار 12 و 2 که به ترتیب بیشترین و کمترین بازدهی را دارا بودند نسبت هسته به بیوپلیمر به ترتیب 1:4 و 1:2 بود که نشان می‌دهد با افزایش درصد روغن نسبت به مواد دیواره بازدهی میکروکپسولاسیون کاهش می‌یابد. مشابه این نتایج در مطالعه انجام شده توسط شریفی و همکاران نیز که در مطالعه آن‌ها نانوریزپوشانی اسیدهای چرب امگا-3 به همراه اسانس میخک در کواسروای حاصل از ژلاتین و صمغ عربی بررسی شد، نشان داده شد که با افزایش مقدار هسته بازدهی ریزپوشانی کاهش یافت (26). در مطالعه جعفرپور و همکاران، تیمارهایی که در آن اسیدهای چرب امگا-3 بیش‌تری استفاده شد، در مقایسه با تیمارهایی با امگا 3 کم‌تر، از بازدهی کم‌تری برخوردار بودند و پودرهای تولیدشده کارایی کپسولاسیون در حدود $69/74$ الی $98/41$ درصد داشتند (23).

تعداد اولیه باکتری‌های زنده قبل از کپسوله شدن $2/4 \times 10^8$ ml/cfu محاسبه شد. بر حسب نتایج به دست آمده تعداد باکتری‌های به دام افتاده در کپسول‌ها $6/37 \times 10^6 \pm 0/02$ تا $1/88 \times 10^3 \pm 0/001$ محاسبه شد. در مطالعه Song و همکاران که سلول‌های مخمر را با روش امولسیون کپسوله کردند، بازدهی 80 درصد گزارش شد (27).

در مطالعه Eratte و همکاران امکان میکروکپسولاسیون امگا-3 روغن ماهی به همراه باکتری‌های پروبیوتیک در پروتئین آب پنیر و صمغ عربی به روش کواسرواسیون مورد بررسی قرار گرفت که در میکروکپسول‌های حاوی

این نتیجه نشان می‌دهد که میکروکپسولاسیون باکتری لاکتوباسیلوس پلانناروم در بستر ژلاتین ماهی - صمغ عربی تا اندازه زیادی منجر به حفاظت سلول باکتری در مقابل شرایط اسیدی معده و روده می‌شود.

Lu و همکاران، زنده‌مانی باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس کپسوله شده با آلژینات و شیر را در شرایط شبیه سازی شده شیر گوارشی مورد ارزیابی قرار دادند که نتایج آن‌ها نشان داد که میکروکپسولاسیون می‌تواند مقاومت لاکتوباسیلوس بولگاریکوس به محیط‌های نامساعد را افزایش دهد (31). Mokarram و همکاران نیز اثر مثبت کپسولاسیون با آلژینات کلسیم بر بهبود بقاء لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در شرایط شبیه‌سازی شده شیر گوارشی را گزارش کردند (17).

Gbassi و همکاران، میکروکپسولاسیون سه سویه از لاکتوباسیلوس پلانناروم در پوشش آلژینات - وی پروتئین را سبب افزایش قابلیت زنده‌مانی باکتری در شرایط شبیه سازی شده معده و روده دانست (32). نتایج مطالعه حاضر، در تناقض با نتایج Krasaekoopt و همکاران، مبنی بر عدم زنده‌مانی باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ATCC1994 کپسوله شده با آلژینات سدیم، کیتوزان و پلی - ال - لیزین در محیط با اسیدیته بالا (33) و هم‌چنین نتایج Gbassi و همکاران مبنی بر عدم محافظت از باکتری‌ها در میکروکپسوله‌های حاوی آلژینات در شرایط اسیدی معده بود (32).

Zou و همکاران پایداری ذخیره‌سازی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم را در میکروکپسول‌های آلژینات، نشاسته، پکتین، کیتوزان و پلی - ال - لیزین مورد مطالعه قرار دادند. میکروکپسول‌های حاوی کیتوزان حمایت بهتری را برای باکتری‌های میکروکپسولاسیون شده نسبت به کپسول‌های دیگر در طول ذخیره‌سازی از خود نشان دادند، این احتمالاً ناشی از یک غشا متراکم تشکیل شده در میکروکپسول‌های پوشیده شده با کیتوزان بوده است (34).

باکتری پروبیوتیک به علت حضور روغن ماهی میزان زنده‌مانی باکتری‌ها افزایش یافت (14).

در مطالعه Pedroso و همکاران نیز میکروارگانسیم‌های میکروکپسوله شده در ماتریکس‌های لیپیدی دارای ماندگاری بیش‌تری نسبت به میکروارگانسیم‌های کپسوله نشده بودند (28). طبق مطالعه پارسا و همکاران روی بهینه‌سازی تولید ماست پروبیوتیک غنی شده با فیتواسترول‌ها، نرخ زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در حضور فیتواسترول‌ها افزایش یافت (29). Klemmer و همکاران دریافتند که سطوح بالاتر پروتئین شیر برای کپسوله کردن پروبیوتیک‌ها به‌طور قابل توجهی باعث افزایش بازده کپسولاسیون شد (30). بنابراین با توجه به مطالعات گذشته، می‌توان نتیجه گرفت که غلظت پلیمر می‌تواند بر بازده میکروکپسول‌ها اثر بگذارد.

نتایج به‌دست آمده از شمارش باکتری‌ها نشان می‌دهد که میکروکپسولاسیون توانسته تاثیر چشمگیری در قابلیت زنده‌مانی باکتری در شرایط شبیه‌سازی شده شیر معده و روده داشته باشد. تعداد اولیه باکتری‌های زنده بعد از قرار گرفتن در شرایط شبیه‌سازی شده معده، از $2/4 \times 10^8$ ml/cfu به $9/3 \times 10^5 \pm 103/05$ کاهش یافت. بر حسب نتایج به دست آمده تعداد باکتری‌های به دام افتاده در میکروکپسول‌ها در سه تیمار که به ترتیب حاوی مواد دیواره ژلاتین ماهی - صمغ عربی، ژلاتین ماهی - کیتوزان و صمغ عربی - کیتوزان بود، $6/37 \times 10^6 \pm 0/02$ ، $7/5 \times 10^3 \pm 0/19$ و $1/88 \times 10^3 \pm 0/001$ محاسبه شد. باکتری‌های کپسوله شده بعد از قرار گرفتن در شرایط شبیه‌سازی شده معده کاهش قابل توجهی نداشتند و افت شدیدی مشاهده نشد و مقدار آن‌ها به ترتیب $0/39 \times 10^6 \pm 0/003$ ، $1 \times 10^3 \pm 0/007$ و $1/8 \times 10^4 \pm 0/03$ محاسبه شد. نتایج حاکی از آن بود که تعداد باکتری‌های آزاد بعد از قرار گرفتن در شرایط روده کاهش می‌یابند اما تنها در تیماری که مواد دیواره شامل ژلاتین - صمغ عربی بود نتایج متفاوت بود و بعد از گذشت 120 دقیقه تعداد باکتری‌ها افزایش یافت که

بین ژلاتین ماهی - صمغ عربی، ژلاتین ماهی - کیتوزان و صمغ عربی - کیتوزان بود. تجزیه و تحلیل نتایج نشان داد که استفاده از تکنیک کوآسرواسیون مرکب با استفاده از ژلاتین ماهی، کیتوزان و صمغ عربی به عنوان بیوپلیمر، می تواند ذرات با اندازه میکرو تولید کند. نتایج بازدهی میکروکپسولاسیون اسیدهای چرب امگا-3 نشان داد که تیمار 12 بالاترین مقدار بازدهی (96/26 ± 0/19) را داشته که در آن مخلوط بیوپلیمر حاوی ژلاتین - کیتوزان درصد بالایی از امگا-3 را احاطه کرده و مقدار امگا-3 که در سطح کپسول حضور داشت بسیار کم بود. در بررسی شاخص های مربوط به بازدهی میکروکپسول های باکتری مشخص شد تیمار 6 با دیواره ژلاتین - صمغ عربی، قابلیت بالایی برای احاطه باکتری داشته و در مقایسه با باکتری های آزاد هنگامی که در شرایط شبیه سازی شده معده قرار گرفت میزان مرگ و میر باکتری در آن کم تر بود. به علاوه بعد از قرار گرفتن در شرایط شبیه سازی شده روده تعداد باکتری ها بعد از گذشت 120 دقیقه افزایش یافت که این امر نشان می دهد کپسول در شرایط قلیایی روده ترکیبات خود را آزاد کرده است. تکنیک میکروکپسولاسیون با روش امولسیون، توانسته راندمان بالایی در به دام انداختن باکتری پروبیوتیکی داشته باشد. بین باکتری های میکروکپسوله شده و آزاد، زنده ماندن و تحمل شرایط شبیه سازی شده شیره گوارشی در باکتری های میکروکپسوله شده به مراتب بالاتر بود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل از طرح پژوهشی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی مازندران با شماره طرح 1344 و به کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1397.318 می باشد از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به دلیل حمایتهاشان تشکر و قدردانی می شود.

یکی از عوامل مهم در ماندگاری و پایداری میکروکپسولاسیون، رطوبت است. محققان نشان دادند ماندگاری باکتری ها در میزان رطوبت 4 درصد (و کم تر از آن) بهبود می یابد (35). طبق نتایج مطالعه حاضر، فعالیت آبی بین 0/01 ± 0/002 تا 0/44 ± 0/02 در تیمارهای مختلف به دست آمد و تغییرات نسبت دیواره به هسته بیش ترین تأثیر را در میزان تغییرات فعالیت آبی پودرهای تولیدی داشت. با افزایش میزان دیواره نسبت به هسته فعالیت آبی پودرها کاهش یافت. قابل ذکر است که تأثیر توأم جنس دیواره، نسبت هسته به دیواره و دور هموزنایزر نیز معنی دار است. محققان زیادی گزارش کردند که وجود روغن در میکروکپسول ها، باعث تبخیر کم تر آب طی فرایند خشک شدن و در نتیجه افزایش رطوبت می شود (36). اندازه میکروکپسول ها، یک خصوصیت مهم برای پایداری و راندمان میکروکپسولاسیون است. اگرچه، میکروکپسوله های با اندازه بزرگ حفاظت بیشتری را ارائه می دهند اما دارای تأثیر سنسوری منفی بر محصول هستند. هم چنین میکروکپسوله های با اندازه کوچک ممکن است حفاظت کافی برای پروبیوتیک ها فراهم نکنند (37،38). در این راستا، گزارش شده است که اندازه زیر 100 μm برای اجتناب از تأثیر سنسوری منفی در محصولات مطلوب است (39).

مشاهده با روش SEM در مطالعه حاضر، نشان داد که میکروکپسول ها از نظر شکل ظاهری تا حدود زیادی به شکل کروی و بیضوی هستند. اگرچه در بررسی شکل ظاهری میکروکپسوله ها، تفکیک مناسبی صورت نگرفته ولی این امر نشان می دهد که با این روش می توان میکروکپسوله های با قطر میکرونی تهیه کرد و با استفاده از آن، بافت نرم تری را در مواد غذایی ایجاد کرد (2،40). هدف از این مطالعه تولید میکروکپسول اسیدهای چرب امگا-3 به همراه باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلاتاروم در کوآسروای حاصل از برهمکنش الکترواستاتیک

References

1. Simopoulos AP, Norman HA, Gillaspay JE, Duke JA. Common purslane: a source of omega-3 fatty acids and antioxidants. *J Am Coll Nutr* 1992; 11(4): 374-382.
2. Eilander A, Hundscheid D, Osendarp S, Transler C, Zock P. Effects of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation on visual and cognitive development throughout childhood: a review of human studies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007; 76(4): 189-203.
3. Miyashita K. Paradox of omega-3 PUFA oxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2014; 116(10): 1268-1279.
4. Kaushik P, Dowling K, Barrow CJ, Adhikari B. Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. *Journal of functional foods* 2015;19:868-881.
5. Gan C-Y, Cheng L-H, Easa AM. Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based microcapsules containing fish oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2008; 9(4): 563-569.
6. Shah NP. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* 2007; 17(11): 1262-1277.
7. Iyer RN, Hittinahalli V. Modified PAP method to detect heteroresistance to vancomycin among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26(2): 176-179.
8. Talwalkar A, Kailasapathy K. A Review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2004; 3(3): 117-124.
9. Ding WK, Shah NP. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *Int Food Res J* 2008; 15(2): 219-232.
10. Jayalalitha V, Balasundaram B, Palanidorai N, Kumar C. Fortification of encapsulated iron in probiotic yoghurt. *Intl J Agric Res & Rev* 2012; 2(2): 80-84.
11. Capela P, Hay TKC, Shah NP. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res Int* 2006; 39(2): 203-211.
12. Das UN, Ramos EJ, Meguid MM. Metabolic alterations during inflammation and its modulation by central actions of omega-3 fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6(4): 413-419.
13. Sharifi E, Yazdani Z, Najafi M, Hosseini-khah Z, Jafarpour A, Rafiei A. The combined effect of fish oil containing Omega-3 fatty acids and *Lactobacillus plantarum* on colorectal cancer. *Food Sci Nutr* 2022; 00: 1-8.
14. Eratte D, McKnight S, Gengenbach TR, Dowling K, Barrow CJ, Adhikari BP. Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates. *Journal of functional foods* 2015; 19: 882-892.
15. Klinkesorn U, Sophanodora P, Chinachoti P, Decker EA, McClements DJ. Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Research International* 2006; 39(4): 449-457.
16. Charteris W, Kelly P, Morelli L, Collins JK. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal of Dairy Technology* 1998; 51(4): 123-136.
17. Mortazavi SA, Najafi MH, Shahidi F. The influence of multi stage alginate coating

- on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International* 2009; 42(8): 1040-1045.
18. Yao M, Xie J, Du H, McClements DJ, Xiao H, Li L. Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2020; 19(2): 857-874.
 19. Panjanapongchai S, Chavapradit C, Anal AK. Microencapsulation of Probiotics and its Potential Industrial Applications. *Probiotics, Prebiotics and Synbiotics: Technological Advancements Towards Safety and Industrial Applications* 2022: 213-232.
 20. Anitha DPM, Sellamuthu PS. Microencapsulation of probiotics in finger millet milk complex to improve encapsulation efficiency and viability. *Food Science and Technology International* 2022; 28(3): 216-232.
 21. Camelo-Silva C, Verruck S, Ambrosi A, Di Luccio M. Innovation and Trends in Probiotic Microencapsulation by Emulsification Techniques. *Food Eng Rev* 2022; 14: 462-490.
 22. Wang X, Gao S, Yun S, Zhang M, Peng L, Li Y, et al. Microencapsulating Alginate-Based Polymers for Probiotics Delivery Systems and Their Application. *Pharmaceuticals* 2022; 15(5): 644.
 23. Jafarpour SA, Esfahani R, Jafari S. Efficiency evaluation of nanoencapsulation of omega-3 fatty acids with gelatin-Arabic gum complex using coaservation technique. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 2016;25(2):29-42.
 24. Velasco J, Holgado F, Dobarganes C, Márquez-Ruiz G. Influence of relative humidity on oxidation of the free and encapsulated oil fractions in freeze-dried microencapsulated oils. *Food Research International* 2009; 42(10): 1492-1500.
 25. Kolanowski W, Laufenberg G, Kunz B. Fish oil stabilisation by microencapsulation with modified cellulose. *Int J Food Sci Nutr* 2004; 55(4):333-343.
 26. Sharifi E, JafarPour SA, Hosseini SMH. Investigating the Effects of Biopolymer Concentration and Core Material Percentage on Quality Characteristics of Fish Oil Nanocapsules Containing Clove Essential Oil Prepared by Complex Coacervation Technique. *Fisheries Science and Technology* 2018; 7(3): 205-213.
 27. Song H, Yu W, Gao M, Liu X, Ma X. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydr Polym* 2013; 96(1): 181-189.
 28. de Lara Pedroso D, Thomazini M, Heinemann RJB, Favaro-Trindade CS. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. *International Dairy Journal* 2012; 26(2): 127-132.
 29. Parsa P, Alizadeh M, Rezazad Bari M, Akbarian Moghar A. Optimisation of probiotic yoghurt production enriched with phytosterols. *Int J Dairy Technol* 2015; 68(4): 557-564.
 30. Klemmer KJ, Korber DR, Low NH, Nickerson MT. Pea protein-based capsules for probiotic and prebiotic delivery. *Int J Food Sci Technol* 2011; 46(11): 2248-2256.
 31. Shi L-E, Li Z-H, Li D-T, Xu M, Chen H-Y, Zhang Z-L, et al. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of food engineering* 2013; 117(1): 99-104.
 32. Gbassi GK, Vandamme T, Ennahar S, Marchioni E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated

- with whey proteins. *Int J Food Microbiol* 2009; 129(1): 103-105.
33. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth HC. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 2004; 14(8): 737-743.
34. Zou Q, Liu X, Zhao J, Tian F, Zhang Hp, Zhang H, et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in Whey Protein-Based Microcapsules by Transglutaminase-Induced Gelation. *J Food Sci* 2012; 77(5): M270-M7.
35. Gardiner GE, O'sullivan EO, Kelly J, Auty MA, Fitzgerald GF, Collins JK, et al. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(6): 2605-2612.
36. Tavakol M, Vasheghani-Farahani E, Dolatabadi-Farahani T, Hashemi-Najafabadi S. Sulfasalazine release from alginate-N, O-carboxymethyl chitosan gel beads coated by chitosan. *Carbohydrate Polymers* 2009; 77(2): 326-330.
37. Ma Y, Pacan JC, Wang Q, Xu Y, Huang X, Korenevsky A, et al. Microencapsulation of bacteriophage Felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(15): 4799-4805.
38. Ma Y, Chu X, Tang G, Yao Y. The effect of different soft segments on the formation and properties of binary core microencapsulated phase change materials with polyurea/polyurethane double shell. *Journal of colloid and interface science* 2013; 392: 407-414.
39. Truelstrup Hansen L, Allan-Wojtas P M, Jin Y-L, Paulson AT. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology* 2002; 19(1): 35-45.
40. Allan-Wojtas P, Truelstrup Hansen L, Paulson A. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. *LWT-Food Science and Technology* 2008; 41(1): 101-108.