

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

Ali Jafarpour¹,
Elahe Sharifi²,
Mojtaba Najafi³,
Alireza Rafiei⁴,
Zahra Hosseinihah⁵

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 Hosseinihah - 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

زهره حسینی خواه⁵

چکیده

سابقه و هدف: در این مطالعه، میکروکپسولاسیون اسیدهای چرب امگا-3 به همراه باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم در کواستروای 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 همونایزر 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 قلیایی روده به خوبی ترکیبات خود را آزاد کرده است.

استنتاج: در نتیجه، استفاده از تکنیک کواسترواسیون 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 لیپیدی 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: زهره حسینی خواه - ساری: مرکز آموزشی درمانی امام خمینی، مرکز تحقیقات دیابت

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

2. دانشجوی دکتری شایلات، 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 ایمونولوژی، مرکز تحقیقات یولوژی 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

در طی فرآیند اکسیداسیون اسیدهای چرب امگا-3، پراکسید تولید می‌شود که در ادامه به ترکیبات فرار تبدیل شده که برخی از آن‌ها طعم نامطلوب تولید می‌کنند و در نهایت موجب کاهش ارزش تغذیه‌ای اسیدهای چرب امگا-3 می‌شوند (3). بنابراین، ارائه راهکارهای مناسب برای افزایش ماندگاری روغن ماهی حاوی اسیدهای چرب غیراشباع برای استفاده آن در صنایع غذایی ضروری است (4). از روش‌های معمول برای حفاظت از روغن ماهی در مقابل اکسیداسیون، اضافه کردن آنتی‌اکسیدان و تکنیک ریزپوشانی است (5).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اثرات سلامتی بخش در میزبان بر جای می‌گذارند. فعالیت و زنده ماندن پروبیوتیک‌ها به هنگام رسیدن به روده شرط لازم برای بروز اثرات سلامتی بخش است (6). باکتری‌های اسیدلاکتیک مهمترین باکتری‌های پروبیوتیک هستند که اثرات سودمندی روی میزبان خود دارند. لاکتوباسیلوس پلانٹاروم یک باکتری پروبیوتیک، گرم مثبت، هتروفرمنتاتیو، میله‌ای، غیر اسپورزا، غیر متحرک و تولیدکننده اسیدلاکتیک می‌باشد (7). برحسب استانداردها، برای بروز ویژگی‌های سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها 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 زنده‌مانی ناچیز ناشی از تنش اسیدیته و اکسیژن توسعه یافته و نقصان مواد غذایی می‌باشد (8). علاوه بر این pH بسیار پایین معده، هم‌چنین حضور نمک‌های صفراوی در روده، دلایل اصلی کاهش ناگهانی در قابلیت زیستی سلول‌های انتقال یافته است. از این رو بررسی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در مسیر دستگاه گوارش از اهمیت زیادی برخوردار است (9:10). جهت غلبه بر این مشکلات، شیوه‌های مختلفی شامل کشت‌های میکروبی؛ افزودن پری‌بیوتیک‌ها و تکنیک میکروکپسوله کردن وجود دارد (11). اثر سینرژیک بین اسیدچرب امگا-3 و باکتری‌های پروبیوتیک در طول هضم به این صورت

گزارش شده است که اسیدهای چرب امگا-3 کمک می‌کنند که باکتری‌های پروبیوتیک به سطح روده متصل شوند (12،13). هم‌چنین حضور اسیدهای چرب امگا-3 در میکروکپسول‌های حاوی باکتری پروبیوتیک میزان زنده‌مانی این باکتری‌ها را افزایش می‌دهد (14). با توجه به نتایج مطالعات قبل مبنی بر تاثیرگذاری باکتری‌های پروبیوتیک، اسیدهای چرب امگا-3 و هم‌چنین اثر افزایش میزان زنده‌مانی این باکتری‌ها در حضور اسیدهای چرب، برای اولین بار میکروکپسولاسیون باکتری‌های پروبیوتیک و اسیدهای چرب مورد بررسی قرار گرفت تا در مطالعات آنتی میزان اثرگذاری این ترکیب در سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

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 پژوهش‌های 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

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 پلاتاروم 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 rpm 8000 سانتریفیوژ شد. محلول رویی فیلتر و کاغذ صافی 2 بار با هگزان شسته شد. هگزان توسط روتاری با دمای 70 درجه سانتی گراد تبخیر شد و روغن باقی‌مانده در 105 درجه سانتی گراد 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 rpm 4000 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 سانتی گراد تبخیر شد و مقدار روغن باقی‌مانده محاسبه شد (15).

بازدهی میکروکپسولاسیون از رابطه زیر محاسبه شد (15):

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

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 سانتی گراد و به مدت 48 ساعت گرمخانه‌گذاری شد و سپس تعداد باکتری‌ها در 3 تکرار شمارش شد.

بررسی زنده ماندن باکتری‌های میکروکپسوله شده در شرایط شبیه‌سازی شده شیر معده و روده

شرایط شبیه‌سازی شده شیر 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.

وسیله اسید کلریدریک استریل ($0/1$ مولار) به $2/5$ رسانده شد، محلول حاصل به وسیله میکروفیلتر $0/45$ میکرومتر استریل شد. شرایط 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 صفراوی (Oxoid, Basingstoke UK) مخلوط شد، سپس pH آن با محلول سود $0/1$ مولار استریل به حدود $7/4$ رسانده شد، محلول حاصل با فیلتراسیون به وسیله میکروفیلتر $0/45$ میکرومتر استریل 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 شبیه سازی 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 و اتر، 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 میکروکپسول های تولید شده

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

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

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

پارامتر	روغن سطحی	روغن کپسوله شده	بازدهی ریزپوشانی	فعالیت آبی
جنس دیواره	ژلاتین - صمغ عربی	42/08± 5/02 ^a	74/02± 10/96 ^c	0/21± 0/1 ^a
	ژلاتین - کیتوزان	10/84± 7/56 ^c	83/50± 10/89 ^b	0/1± 0/02 ^b
	صمغ عربی - کیتوزان	13/87± 7/46 ^b	81/63± 3/63 ^b	0/9± 0/01 ^b
نسبت دیواره به هسته	21	50/93± 5/86 ^c	71/98± 9/59 ^c	0/11± 0/03 ^b
	31	48/21± 8/85 ^c	78/43± 10/62 ^b	0/19± 0/1 ^a
	41	60/19± 21/91 ^a	88/94± 5/58 ^a	0/08± 0/01 ^c

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

فعالیت آبی میکروکپسول های تولید شده

نتایج اندازه گیری فعالیت آبی میکروکپسول های

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 می شود. هم چنین کم ترین سطح فعالیت آبی به تیمار 16 با جنس دیواره صمغ عربی - کیتوزان مربوط می شود. به منظور بررسی اثرات جداگانه و توأم تیمارهای مورد آزمایش بر پارامتر فعالیت آبی از آزمون چند متغیره استفاده شد که نتایج آن در جدول های 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 هموژنایزر نیز معنی دار است. میزان فعالیت آبی در کپسول هایی که حاوی کیتوزان هستند اختلاف معنی داری ندارند.

تعداد باکتری های به دام افتاده در کپسول ها

تعداد اولیه باکتری های 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 باکتری های میکروکپسولاسیون شده در آن ها بررسی شد (جدول شماره 4 و 5). بر حسب نتایج به دست 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 بیش ترین مقدار باکتری توسط دیواره ژلاتین و صمغ عربی میکروکپسوله شده بود اما بین کپسول های با جنس دیواره ژلاتین - کیتوزان و صمغ عربی - کیتوزان اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول شماره 4).

نرخ زنده ماننی 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 نمونه ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. تصویر شماره 1، تصاویر میکروسکوپی پودرهای خشک شده با خشک کن انجمادی را نشان می دهد.

جدول شماره 4: شمارش تعداد باکتری های به دام افتاده در کپسول ها

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

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

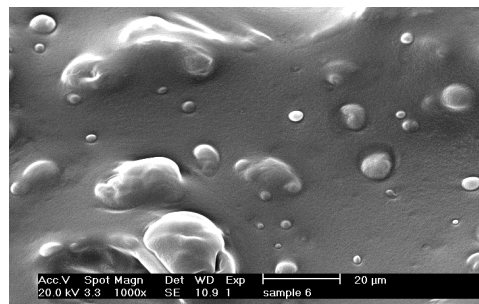
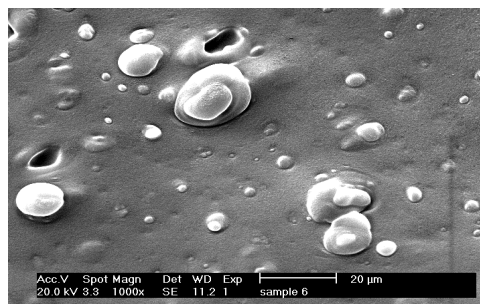
جدول شماره 5: آنالیز واریانس یک طرفه باکتری های به دام افتاده

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

جدول شماره 6: تعداد (cfu/g) باکتری های زنده مانده لاکتوباسیلوس پلاتناروم آزاد و میکروکپسوله شده در شرایط شبیه سازی شده معده و روده در توالی های زمانی مختلف در دمای 37 درجه سانتی گراد

تیمار	بیوپلیمر	0 دقیقه	60 دقیقه	120 دقیقه
شاهد	آزاد	$9/3 \times 10^7 \pm 0/05^a$	$4/9 \times 10^9 \pm 0/7^b$	$3/9 \times 10^9 \pm 0/05^c$
6	ژلاتین - صمغ عربی	$0/39 \times 10^9 \pm 0/003^c$	$1/3 \times 10^9 \pm 0/01^b$	$2/1 \times 10^9 \pm 0/04^a$
12	ژلاتین - کیتوزان	$1 \times 10^9 \pm 0/007^a$	$0/041 \times 10^9 \pm 0/0007^b$	$0/012 \times 10^9 \pm 0/0003^c$
18	صمغ عربی - کیتوزان	$1/8 \times 10^4 \pm 0/03^b$	$0/028 \times 10^4 \pm 0/0003^b$	$0/033 \times 10^4 \pm 0/001^b$

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



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 آبزیان استفاده کرد. با توجه به پتانسیل بالقوه ایران در این زمینه (پوست و استخوان‌های ماهی، میگو و خرچنگ) و اهمیت روزافزون 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 اذعان 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 نانوریز پوشانی 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 آب‌پنیر و صمغ عربی به روش کواسرواسیون مورد بررسی قرار گرفت که در میکروکپسول‌های حاوی

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

در مطالعه Pedrosa و همکاران نیز میکروارگانیسم‌های میکروکپسوله شده در ماتریکس‌های لیپیدی دارای ماندگاری بیش‌تری نسبت به میکروارگانیسم‌های 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 مده 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 $9/3 \times 10^3 \pm 103/05$ 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، $1/88 \times 10^3 \pm 0/001$ و $7/5 \times 10^3 \pm 0/19$ ، $6/37 \times 10^6 \pm 0/02$ 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

این نتیجه نشان می‌دهد که میکروکپسولاسیون باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم 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 شبیه‌سازی 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 پلانتاروم در پوشش آلژینات - وی پروتئین را سبب افزایش قابلیت زنده‌مانی باکتری در شرایط شبیه‌سازی 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 میکروکپسول‌های 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).

یکی از عوامل مهم در ماندگاری و پایداری میکروکپسولاسیون، رطوبت است. محققان نشان دادند ماندگاری باکتری‌ها در میزان رطوبت 4 درصد (و کم‌تر از آن) بهبود می‌یابد (35). طبق نتایج مطالعه حاضر، فعالیت آبی بین $0/01 \pm 0/002$ تا $0/44 \pm 0/02$ در تیمارهای مختلف به دست آمد و تغییرات نسبت دیواره به هسته بیش‌ترین 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 هموژنايزر نیز معنی دار است. محققان زیادی گزارش کردند که وجود روغن در میکروکپسول‌ها، باعث تبخیر کم‌تر آب طی فرایند خشک شدن و در نتیجه افزایش رطوبت می‌شود (36). اندازه میکروکپسول‌ها، یک خصوصیت مهم برای پایداری و راندمان میکروکپسولاسیون است. اگرچه، میکروکپسوله‌های با اندازه بزرگ حفاظت بیشتری را ارائه می‌دهند اما دارای تأثیر سنسوری منفی بر محصول هستند. هم‌چنین میکروکپسوله‌های با اندازه کوچک ممکن است حفاظت کافی برای پروبیوتیک‌ها فراهم نکنند (37، 38). در این راستا، گزارش شده است که اندازه زیر $100 \mu m$ برای اجتناب از تأثیر سنسوری منفی در محصولات مطلوب است (39).

مشاهده با روش SEM در مطالعه حاضر، نشان داد که میکروکپسول‌ها از نظر شکل ظاهری تا حدود زیادی به شکل کروی و بیضوی هستند. اگرچه در بررسی شکل ظاهری میکروکپسوله‌ها، تفکیک مناسبی صورت نگرفته ولی این امر نشان می‌دهد که با این روش می‌توان میکروکپسوله‌های با قطر میکرونی تهیه کرد و با استفاده از آن، بافت نرم‌تری 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

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، می‌تواند ذرات با اندازه میکرو تولید کند. نتایج بازدهی میکروکپسولاسیون اسیدهای چرب امگا-3 نشان داد که تیمار 12 بالاترین مقدار بازدهی ($96/26 \pm 0/19$) 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 شاخص‌های مربوط به بازدهی میکروکپسول‌های باکتری مشخص شد تیمار 6 با دیواره ژلاتین - صمغ عربی، قابلیت بالایی برای احاطه باکتری داشته و در مقایسه با باکتری‌های آزاد هنگامی که در شرایط شبیه سازی شده معده قرار گرفت میزان مرگ و میر باکتری در آن کم‌تر بود. به علاوه بعد از قرار گرفتن در شرایط شبیه‌سازی شده روده تعداد باکتری‌ها بعد از گذشت 120 دقیقه افزایش یافت که این امر نشان می‌دهد 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 باکتری‌های میکروکپسوله شده و آزاد، زنده‌مانی و تحمل شرایط شبیه‌سازی شده شیره گوارشی در باکتری‌های 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 می‌باشد از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به دلیل حمایت‌هایشان تشکر و قدردانی می‌شود.

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, Palanidurai 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.