

Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* with gelatin-hydrolyzed fish protein using the freeze-drying method and evaluation of antioxidant properties

Yaghoubzadeh Z.^{1*}; Turk Pahnabi F.¹

*za_yaghoub@yahoo.com

1-Caspian Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran

Received: June 2025

Accepted: August 2025

Published: September 2025



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

Among various probiotic strains, lactic acid bacteria (LAB) have been the most extensively studied (Anal and Singh, 2007). *Lactobacillus plantarum*, a prominent LAB species, exhibits a wide range of bioactivities, including inhibition of pathogenic bacteria, improvement of gut microbiota, modulation of the immune system, and regulation of glucose and lipid metabolism. These features make *L. plantarum* a promising candidate for promoting gastrointestinal, metabolic, and cardiovascular health (Collantes *et al.*, 2023). Nevertheless, like many other probiotic species, *L. plantarum* is susceptible to environmental stresses such as high temperature, low pH, salt, oxygen, and bile salts during processing and digestion, which may limit its functionality and efficacy (Ranadheera *et al.*, 2010). One promising approach to improve probiotic viability is microencapsulation, a technique that involves embedding microorganisms within protective coatings or matrices. This not only shields probiotics from adverse conditions but also allows for targeted and controlled release at the desired site in the gastrointestinal tract. Additionally, microencapsulation can mask undesirable flavors in probiotic-containing food products (Fraj *et al.*, 2021). Several encapsulation techniques are available, including extrusion, emulsification, spray drying, freeze drying, and cold spraying, each with its specific advantages and limitations (Luca and Oroian, 2021). Among these, freeze drying has attracted considerable attention due to its capacity to preserve the structure and bioactivity of probiotics. The selection of appropriate wall materials during freeze drying is critical for minimizing cellular damage and enhancing bacterial viability. Moreover, controlling parameters such as temperature and residual moisture is essential to maintain probiotic stability. *L. plantarum* thrives in slightly acidic conditions (pH 5.0–6.2), a factor that should be considered when designing preservation and storage conditions (Pramono *et al.*, 2025). The choice of wall material plays a vital role in determining the efficiency, release profile, and functional properties of the microcapsules (Ozdemir *et al.*, 2021). Commonly used wall materials include polysaccharides, proteins, and lipids. Among them, proteins are desirable due to their biocompatibility, low cost, availability, and desirable physicochemical characteristics (Vaziri *et al.*, 2018). Gelatin, a widely used protein-based material, is biodegradable, biocompatible, and cost-effective, exhibiting a high molecular interaction capacity, making it suitable for

encapsulation applications (Bastos *et al.*, 2021). On the other hand, fish protein hydrolysate (FPH), derived from aquatic by-products such as skin, scales, and bones, is rich in bioactive peptides with antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, immunomodulatory, and antihypertensive properties, and is widely used in the food and pharmaceutical industries (Nemati *et al.*, 2021). These peptides, produced through enzymatic hydrolysis of fish proteins, possess low molecular weight, high solubility, and desirable bioactivity, making them effective protective agents in the microencapsulation of probiotics such as *L. plantarum* (González-Serrano *et al.*, 2022). Due to its antioxidant capacity, FPH protects probiotic cells against oxidative stress during freeze-drying and storage. Furthermore, its antibacterial peptides contribute to enhanced product safety. When combined with gelatin, FPH forms a protective matrix that shields bacteria from harsh gastric conditions (Nemati *et al.*, 2024). Additionally, the peptides and amino acids present in FPH can serve as a nutrient source for probiotics, thereby enhancing their viability (Shori, 2017). From an environmental perspective, the utilization of fish waste for FPH production represents a sustainable and cost-effective approach (Kristinsson and Rasco, 2000). Given these advantages, the present study employed a combination of commercial bovine gelatin and fish protein hydrolysate as a wall material for the microencapsulation of *L. plantarum* using freeze-drying technology. This research aimed to evaluate the potential of this biopolymeric blend in enhancing the viability and stability of *L. plantarum* under adverse environmental conditions.

Methodology

A 50g sample was mixed with 100 ml of distilled water and heated at 85°C for 20 min to inactivate endogenous enzymes. After cooling, pepsin was added (1% of total protein) and hydrolysis occurred at pH 5.8 and 58°C for 90 min. The mixture was then heated at 90°C for 10 min to inactivate the enzyme, cooled, centrifuged, and the supernatant was collected and freeze-dried (Ojagh *et al.*, 2012). To prepare *L. plantarum* cultures, 1g of lyophilized powder was dissolved in 9 ml of sterile phosphate buffer, and 0.1 ml of the suspension was spread on an MRS agar plate. After anaerobic incubation at 37°C for 24 h, the cells were scraped off the plate with 2 ml of sterile phosphate buffer, and the resulting slurry was centrifuged at 13,000×g for 1 min. Gelatin (5g) and fish protein hydrolysate (5g) were dissolved in 1 liter of distilled water, maintained at 45°C for 30 min, and cooled to 25°C. A *L. plantarum* suspension (1×10^8 CFU/g) was added, and the mixture was homogenized at 350 rpm for 15 min (Heinzelmann *et al.*, 2000).

The suspension was frozen at -80°C for 24 h and then freeze-dried for 3-4 days at 30 Pa with a condenser temperature of -60°C (Machado *et al.*, 2022). The DPPH radical scavenging activity was assessed according to the method described by Dadmehr *et al.* (2024). In brief, 100 µl of each sample solution was mixed with 3.9 ml of DPPH solution. Absorbance was measured at 518 nm using a spectrophotometer at 5-min intervals. Calibration was performed in the range of 5–30 min. The FRAP assay was performed as previously described by Dadmehr *et al.* (2024). The FRAP reagent was prepared by mixing acetate buffer (300 mM), TPTZ solution (10 nM in 40 mM HCl), and FeCl₃ (20 mM) in a 10:1:1 (v/v/v) ratio and incubated at 37°C. Then, 100 µl of the sample was added to 3 ml of the FRAP reagent, and absorbance was recorded at 593 nm. A calibration curve was constructed within 5–30 min. BHA was also analyzed under the same conditions as a reference antioxidant.

Results

Moisture content was 7.5% and water activity was 0.32 ± 0.02 . Particle size analyzer output showed that the average diameter of microcapsules in the final freeze-dried product was 1.62 ± 0.47 µm (mean ± ST). Phase contrast microscopy observations showed relatively uniform and round capsules in the final product.

SEM observation showed that *L. plantarum* was successfully encapsulated with gelatin-hydrolyzed fish protein and the capsules produced were mostly spherical and elliptical. The results of this study showed that the DPPH free radical activity increased with increasing concentration. ($p < 0.05$) Microencapsulated Lactobacillus had the highest antioxidant activity of 25.33% at a concentration of 250 mg/ml, and the DPPH free radical activity at this concentration was not significantly different from the synthetic antioxidant BHA. ($p > 0.05$). The results of this study showed that the reducing power (FRAP) increased with increasing concentration. Microencapsulated *L. plantarum* had the highest antioxidant activity at a concentration of 250 mg/ml, and the FRAP at this concentration was significantly higher than the synthetic antioxidant (BHA) ($187.5 \mu\text{mol/g}$) ($p < 0.05$).

Discussion and conclusion

The results showed that the microencapsulated wall containing Lactobacillus, combined with gelatin and hydrolyzed protein, had a moisture content of 7.5% and a water activity of 0.32 ± 0.02 , indicating the physical stability and good shelf life of the system. The low water activity, which prevents the growth of unwanted microorganisms and chemical degradation, plays a crucial role in protecting probiotics. Low moisture also prevents the fragility of the structure (Hasniah, 2022). The use of gelatin and hydrolyzed protein has created a resistant and controlled matrix in water retention, increased mechanical stability and resistance to environmental conditions (Mushtaq *et al.*, 2022). Examination of the surface structure of the microencapsulated particles using scanning electron microscopy (SEM) indicated the success of the microencapsulation process with a combination of gelatin and hydrolyzed fish protein. The particles had a relatively uniform and spherical structure and their surface showed a dense texture without cracks. It has been confirmed that the stability of probiotics decreases under oxidative conditions. Therefore, the use of agents with antioxidant activity can help increase the survival of microencapsulated probiotics (Dadmehr *et al.*, 2024). The compounds resulting from protein hydrolysis, depending on the type of initial protein and the hydrolysis method, can include free amino acids, small peptides, and in some cases, larger protein molecules remaining (Ramezani *et al.*, 2018). Gelatin and bioactive peptides have been reported as natural antioxidants, which were used as a protective layer in this study (Yaghoubzadeh *et al.*, 2019; Nurilmala *et al.*, 2020). The antioxidant activity of gelatin is due to its peptides, which contain high amounts of arginine, tyrosine, and phenylalanine and are thought to have higher antioxidant activity (Shiao *et al.*, 2021). These coatings may enhance the antioxidant activity of microencapsulated *L. plantarum*. The results obtained from the antioxidant tests showed that the radical scavenging activity and reducing power of the microencapsulated samples increased significantly with increasing concentration. In the DPPH test, the percentage of free radical scavenging increased from 10.25% at a concentration of 15.625 mg/ml to 25.33% at a concentration of 250 mg/ml. Similarly, in the FRAP test, the reducing power value increased from $0.297 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ at a concentration of 625.15 mg/ml to $187.5 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ at a concentration of 250 mg/ml. This dose-dependent increase indicates the presence of bioactive compounds with antioxidant properties in the coating formulation. Hydrolyzed fish proteins are rich in peptides with functional groups (such as $-\text{NH}_2$ and $-\text{COOH}$) that can react with free radicals. (Harnedy and FitzGerald, 2012) In addition, the gelatinous structure of the matrix may also play a role in stabilizing the antioxidant compounds (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). The test results are in line with similar studies. For example, Wang *et al.* (2017) in a similar study showed that microcapsules containing peptide-coated probiotics showed higher DPPH and FRAP activity at higher concentrations. Also, the study by Mehdipour Biregani and Ahari (2021) reported that hydrolysates derived from fish protein have a high ability to absorb free

radicals. The results obtained indicate that the developed microencapsulation system not only increased the stability of *L. plantarum*, but also provided significant antioxidant properties, which can be used as a bioactive carrier in functional products. Wang *et al.* reported that microencapsulation of *L. plantarum* with gelatin increased its stability and antioxidant properties under different conditions (Wang *et al.*, 2019). In another study, Cui *et al.* (2021) showed that the use of marine-derived peptides in the coating of microcapsules led to a significant improvement in antioxidant activity in DPPH and ABTS assays (Cui *et al.*, 2021). They attributed this effect to the presence of amine and hydrophobic active groups in the coating composition. Razavi *et al.* (2020) reported that coating *L. plantarum* with gum arabic and alginate increased antioxidant activity, but the extent of this increase was less than that of protein coatings such as gelatin and FPH. Also, Hebert *et al.* (2017) pointed out the synergistic effects between probiotic bacteria and marine bioactive peptides, which led to the enhancement of biological functions, including antioxidant properties (Hebert *et al.*, 2017). The results of this study are consistent with the study of Wang *et al.* (2019) who showed that gelatin microencapsulation can significantly increase the antioxidant activity of *L. plantarum*. Also, Cui *et al.* (2021) reported that the combination of marine peptides with probiotic bacteria resulted in high iron (Fe^{3+}) reduction potential and enhanced antioxidant function, which is consistent with the results of the FRAP assay. In addition, the study conducted by Razavi *et al.* (2020) who investigated the antioxidant activity of *L. plantarum* microencapsulated with gum arabic and alginate confirmed a dose-dependent increase in FRAP; however, the reducing power was reported to be lower compared to protein functional groups in peptides derived from protein sources, which play an important role in electron transfer in the FRAP assay (Hebert *et al.*, 2017). In the present study, the reduction in water activity due to the use of a combination of gelatin and hydrolyzed rainbow trout proteins can help create a limiting environment for destructive reactions (such as oxidation and enzymatic degradation), which is consistent with the results of previous studies. Microencapsulation of *L. plantarum* with a combination of gelatin and hydrolyzed fish protein not only increases bacterial survival under oxidative conditions, but also plays an effective role in enhancing antioxidant properties through chemical interactions with radicals and metal ions. This feature allows the use of this compound in the food and pharmaceutical industries as a natural and safe alternative to synthetic antioxidants such as BHA.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest

Acknowledgment

This research was supported by Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI).

مقاله علمی - پژوهشی:

ریزپوشانی باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* با ژلاتین - پروتئین هیدرولیز شده ماهی با استفاده از روش خشک کن انجمادی و ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی

زهرا یعقوب زاده^{۱*}، فائزه ترک پهنابی^۱

*za_yaghoub@yahoo.com

۱-پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

تاریخ چاپ: شهریور ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۴

چکیده

استفاده از پروتئین‌ها در اسکلت ریزپوشانی باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* می‌تواند گزینه مناسبی برای توسعه محصولات غذایی پروبیوتیک باشد. در این پژوهش، تأثیر ترکیب برابر ژلاتین و پروتئین هیدرولیز شده ماهی (نسبت ۵۰:۵۰) بر پایداری *L. plantarum* بررسی شده و اثر شرایط فرآوری بر خصوصیات فیزیکی شیمیایی پودر حاصل از ریزپوشانی این باکتری به روش خشک کردن انجمادی مورد ارزیابی قرار گرفته است. در بررسی ساختار سطحی ذرات ریزپوشانی شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مشاهده شد، ذرات دارای ساختاری نسبتاً یکنواخت و کروی بودند و سطح آنها بافتی متراکم و بدون ترک را نشان داد. میزان رطوبت ۷/۵ درصد و فعالیت آبی مطلوب 0.32 ± 0.02 بود. علاوه بر این، ظرفیت آنتی اکسیدانی لایه‌های محافظ پس از ریزپوشانی کردن بررسی شد. نتایج نشان داد فعالیت مهار رادیکال (DPPH) تا ۲۵/۳۳٪ و پتانسیل آنتی اکسیدانی احیاء کننده آهن (FRAP) نیز ۵/۱۸۷ بوده است ($p < 0.05$). همچنین همبستگی مثبت قوی بین غلظت و فعالیت آنتی اکسیدانی بر اساس آزمون DPPH و FRAP به ترتیب $R^2 = 0.8347$ و $R^2 = 0.9265$ وجود دارد ($p < 0.05$). پوشش به عنوان یک مانع محافظ برای مهار مؤثر رادیکال‌های فعال اکسیژن عمل می‌کند. این ویژگی، امکان استفاده از این ترکیب را در صنایع غذایی و دارویی به عنوان جایگزینی طبیعی و ایمن برای آنتی اکسیدان‌های مصنوعی نظیر BHA فراهم می‌آورد.

کلمات کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده ماهی، *Lactobacillus plantarum*، ریزپوشانی، فعالیت آنتی اکسیدانی

*نویسنده مسئول



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به میزان کافی، می‌توانند اثرات مفیدی بر سلامت میزبان داشته باشند. برای اثربخشی مطلوب، این میکروارگانیسم‌ها باید حداقل دارای 10^6 واحد زنده در هر گرم از محصول باشند. با این حال، بسیاری از پروبیوتیک‌ها قادر نیستند این میزان را در روده حفظ کنند، زیرا طی فرآیندهای تولید، ذخیره‌سازی و مصرف، در معرض عوامل محیطی نامساعدی مانند حرارت، اسیدیته معده و آنزیم‌های گوارشی قرار می‌گیرند که باعث کاهش زنده‌مانی آنها می‌شود (Guo et al., 2024). از این رو، یافتن روش‌هایی برای افزایش بقا این میکروارگانیسم‌ها تا رسیدن به روده، امری ضروری است.

در میان پروبیوتیک‌ها، باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB) بیشترین میزان مطالعه را به خود اختصاص داده‌اند (Anal and Singh, 2007). یکی از گونه‌های مهم در این گروه، *Lactobacillus plantarum* است که دارای خواص زیستی متعددی نظیر مهار باکتری‌های بیماری‌زا، بهبود محیط روده، تنظیم سیستم ایمنی، حفظ تعادل قند و چربی خون و کاهش اختلالات متابولیک است. این خواص، *L. plantarum* را به گزینه‌ای مؤثر در ارتقاء سلامت دستگاه گوارش، سیستم ایمنی و سلامت قلبی-عروقی تبدیل کرده‌اند (Collantes et al., 2023). با وجود این، این باکتری نیز مانند بسیاری دیگر از پروبیوتیک‌ها در برابر تنش‌های محیطی مانند دمای بالا، اسیدیته، نمک، اکسیژن و ترکیبات صفراوی، در طول فراوری و گوارش انسانی آسیب‌پذیر است که این موضوع اثرگذاری آن را محدود می‌کند (Ranadheera et al., 2010).

یکی از روش‌های مؤثر برای افزایش پایداری و زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها، ریزپوشانی است. این تکنیک شامل محصور کردن میکروارگانیسم‌ها در ساختارهایی غشایی یا ذره‌ای است که آنها را از آسیب‌های محیطی محافظت می‌کند و امکان رهایش کنترل‌شده را در محل مورد نظر فراهم می‌سازد. ریزپوشانی می‌تواند طعم‌های ناخوشایند محصولات حاوی پروبیوتیک را نیز پوشش دهد (Fraj et al., 2021). روش‌های مختلفی برای ریزپوشانی وجود دارد؛ از جمله

اکستروژن، امولسیون‌سازی، خشک‌سازی پاششی، انجماد و اسپری سرد که هر کدام دارای مزایا و محدودیت‌های خاص خود هستند (Luca and Oroian, 2021).

در میان این روش‌ها، خشک‌کردن انجمادی به دلیل حفظ ساختار و فعالیت زیستی پروبیوتیک‌ها، مورد توجه قرار گرفته است. در این فرآیند، استفاده از مواد پوششی مختلف می‌تواند آسیب‌های وارده به باکتری‌ها را کاهش داده و قابلیت زنده‌مانی آنها را افزایش دهد. همچنین حفظ دما و رطوبت مناسب در حین خشک‌کردن انجمادی از اهمیت بالایی برخوردار است. *L. plantarum* در محیط‌هایی با pH نسبتاً پایین (در بازه ۵-۶/۲) رشد مطلوب‌تری دارد که می‌تواند در طراحی شرایط نگهداری مؤثر واقع شود (Pramono et al., 2025).

انتخاب ماده دیواره در فرآیند ریزپوشانی، نقش کلیدی در پایداری، آزادسازی و ویژگی‌های عملکردی کیسول‌ها ایفاء می‌کند (Ozdemir et al., 2021). از میان مواد رایج برای دیواره، پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و چربی‌ها به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند. پروتئین‌ها به دلیل ایمنی، دسترسی، قیمت مناسب و خواص فیزیکی‌شیمیایی مناسب، انتخاب محبوبی به شمار می‌روند (Vaziri et al., 2018). ژلاتین به عنوان یکی از پروتئین‌های پرکاربرد، ویژگی‌هایی نظیر هزینه پایین، زیست‌تجزیه‌پذیری، سازگاری زیستی و ظرفیت تعامل مولکولی بالا دارد که آن را برای این منظور مناسب می‌سازد (Bastos et al., 2021).

پروتئین هیدرولیز شده ماهی (FPH) که از ضایعات آبزیان مانند پوست، فلس و استخوان تهیه می‌شود، سرشار از پپتیدهای زیست‌فعال با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد التهابی، تنظیم‌کننده ایمنی و ضد فشار خون است و در صنایع غذایی و دارویی کاربرد گسترده‌ای دارد (Nemati et al., 2024). این پپتیدها، حاصل هیدرولیز آنزیمی پروتئین ماهی، به دلیل وزن مولکولی پایین، حلالیت بالا و خواص زیستی مطلوب، در ریزپوشانی پروبیوتیک‌هایی مانند *L. plantarum* نقش حفاظتی دارند (González-Serrano et al., 2022). FPH با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، از سلول‌های پروبیوتیک در برابر استرس‌های اکسیداتیو حین فریزدراپینگ و نگهداری محافظت می‌کند و به دلیل دارا

تهیه پروتئین هیدرولیز شده ماهی

برای انجام فرآیند هیدرولیز، ابتدا ضایعات ماهی منجمد شده در دمای اتاق یخ‌زدایی شدند. سپس ۵۰ گرم از نمونه وزن‌کشی شده و به ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر (نسبت وزنی به حجمی ۱:۲) به ارلن اضافه شد. ارلن به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا آنزیم‌های داخلی امعاء و احشاء ماهی غیر فعال شوند (Guerard et al., 2002). پس از خنک شدن، آنزیم پپسین (استخراجی از مخاط معده خوک) به میزان ۱ درصد از محتوای پروتئین به ارلن افزوده شد و هیدرولیز به مدت ۹۰ دقیقه در pH برابر با ۵.۸ و دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد (pH محلول به وسیله اسید کلریدریک و سود با استفاده از pH متر تنظیم شد). سپس فرآیند حرارتی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه برای غیرفعال کردن آنزیم‌ها صورت گرفت. پس از این مرحله، ارلن‌ها در دمای محیط خنک شدند و سپس محتویات آنها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت $\times 10,000$ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت‌ها (مایعات رویی) با استفاده از خشک‌کن انجمادی خشک شدند (Ojagh et al., 2012). پودر حاصل در کیسه زیپ‌دار در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه باکتری *L. plantarum*

L. plantarum باکتری مورد مطالعه بود که به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه گردید. ابتدا یک گرم از پودر باکتری *L. plantarum* در ۹ میلی‌لیتر بافر فسفات استریل حل شد سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول بر روی یک پلیت MRS آگار قرار داده شد. پلیت تلقیح شده در جار بی‌هوازی قرار داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس دو میلی‌لیتر بافر فسفات استریل به پلیت‌ها اضافه شده برای جمع‌آوری *L. plantarum* سطح صفحه خراش داده شد و دوغاب حاصل با استفاده از میکروسانتریفیوژ (Eppendorf MiniSpin plus، هامبورگ، آلمان) در $\times 13,000$ g به مدت

بودن پپتیدهای ضدباکتریایی، موجب افزایش ایمنی محصول می‌شود. ترکیب آن با ژلاتین، بستر محافظی ایجاد می‌کند که از باکتری‌ها در برابر شرایط سخت معده محافظت می‌نماید (Nemati et al., 2024). همچنین پپتیدها و آمینواسیدهای FPH می‌توانند به عنوان منبع تغذیه پروبیوتیک‌ها عمل کنند و زنده‌مانی آنها را افزایش دهند (Shori, 2017). از نظر زیست‌محیطی نیز بهره‌برداری از ضایعات ماهی برای تولید FPH، رویکردی پایدار و اقتصادی است (Kristinsson and Rasco, 2000).

با توجه به این مزایا، در مطالعه حاضر، ترکیبی از ژلاتین گاوی تجاری و پروتئین هیدرولیز شده ماهی به عنوان ماده دیواره برای ریزپوشانی باکتری *L. plantarum* با استفاده از روش خشک‌کردن انجمادی مورد استفاده قرار گرفت. هدف این پژوهش، ارزیابی پتانسیل این ترکیب در بهبود زنده‌مانی و پایداری باکتری *L. plantarum* در برابر شرایط محیطی نامطلوب است.

مواد و روش کار

مواد

ضایعات ماهی قزل‌آلا (۵۰۰ گرم) برای تهیه پروتئین هیدرولیز شده از بازار ماهی فروشان شهرستان ساری خریداری شد. سویه *Lactobacillus plantarum* ATCC ۱4917 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تأمین گردید. آنزیم پپسین مورد استفاده در این مطالعه، محصول شرکت سیگما آلدریج بوده و از طریق شرکت آزمیران تهیه شده است. ژلاتین گاوی نیز با همین منبع تهیه گردیده و دارای ویژگی‌های ذیل است: این ماده، یک پروتئین خالص استخراج‌شده از کلاژن موجود در پوست، استخوان و بافت‌های همبند گاو است. ژلاتین به صورت پودری به رنگ سفید تا زرد کم‌رنگ، بدون بو و طعم خاص، و قابل‌حل در آب گرم ارائه می‌شود. ترکیب آن شامل حدود ۸۰ درصد پروتئین، ۱۳ درصد آب و حدود ۲ درصد مواد معدنی است. بررسی مورفولوژی ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی در مرکز پژوهش متالورژی رازی تهران انجام شد و عمل خشک‌کن انجمادی در پارک علم و فناوری ساری صورت گرفت.

۱ دقیقه پلت (به شکل گلوله) شده سپس پلت دو بار با بافر فسفات استریل شسته شدند.

ریز پوشانی *L. plantarum* با روش خشک کن انجمادی

بر اساس روش Rajam و همکاران (۲۰۱۲) ابتدا ۵ گرم ژلاتین با ۵ گرم پروتئین هیدرولیز شده ماهی در ۱ لیتر آب مقطر یکنواخت شدند. سپس سوسپانسیون در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری قرار گرفتند و تا دمای ۲۵ درجه سانتی گراد خنک شدند سپس سوسپانسیون میکروبی با غلظت 1×10^8 CFU/g مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه با همزن با دور ۳۵۰ rpm هموژن شدند (Rajam et al., 2012). سپس محلول به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد منجمد و به مدت ۳ تا ۴ روز به خشک کن انجمادی منتقل شدند (Tamara, 2024). فشار مطلق تجهیزات خشک کن روی ۳۰ پاسکال و دمای تله سرد روی ۶۰- درجه سانتیگراد تنظیم شد. نمونه‌ها پس از ۳۰ ساعت خشک شدن، برداشته شده، در یک کیسه فویل آلومینیومی مات نگهداری شدند و سپس برای استفاده‌های بعدی در یک دسیکاتور با رطوبت نسبی ۲۰٪ قرار داده شدند (Heinzelmann et al., 2000).

اندازه‌گیری رطوبت و فعالیت آبی AW میکروکپسول‌ها

میزان رطوبت میکروکپسول‌های به‌دست‌آمده از خشک کن انجمادی در هوای گرم آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت و در سه تکرار تعیین شد. فعالیت آبی AW میکروکپسول‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه سنجش فعالیت آب (LabMaster Neo, سوئیس) اندازه‌گیری شد. قبل از اندازه‌گیری AW میکروکپسول‌ها، برای دقت بیشتر، دستگاه با آب مقطر کالیبره شد (Arepally and Goswami, 2019).

بررسی مورفولوژی ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی

برای تأیید اندازه، مورفولوژی ذرات میکرو کپسول ریزپوشانی شده، از میکروسکوپی الکترونی روبشی استفاده می‌گردد. نمونه‌های خشک‌شده، بر روی پین‌های آلومینیومی چسبانده شده و با استفاده از یک لایه نازک رسانا (طلا و پالادیوم) پوشانده می‌شوند. این عمل با کمک ابزاری به نام پوشش دهنده و با استفاده از میدان الکتریکی و گاز آرگون انجام می‌گردد. دستگاه SEM مورد استفاده مدل KYKY - EM ۳۲۰۰ ساخت کشور چین است. ولتاژ دستگاه ۲۶ کیلو ولت است و با استفاده از نیروی اتمی ساختار مورد بررسی قرار می‌گیرد. برای لایه‌گذاری طلا و پالادیوم نیز از دستگاه KYKY مدل SBC - ۱۲ ساخت کشور چین استفاده می‌گردد (Machado et al., 2022).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی *L. plantarum* ریزپوشانی شده

برای بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پوشش ژلاتین با پروتئین هیدرولیز شده ماهی، از دو شاخص قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی (FRAP) استفاده می‌شود. ۵ غلظت (۱۵/۶۲۵، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، و ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از متابولیت، بعد از آماده سازی مواد و معرف‌ها در هر روش، جهت بررسی خواص آنتی اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج خواص آنتی‌اکسیدانی پوشش ژلاتین با پروتئین هیدرولیز شده ماهی با آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHA مقایسه خواهد شد (Kulawik et al., 2023).

فعالیت مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲ دیفنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)

برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروبیوتیک‌های دو لایه، سنجش DPPH طبق پروتکل Dadmehr و همکاران (۲۰۲۴) انجام شد. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نمونه (سدیم فیتات، ژلاتین و Bs) به ۳.۹ میلی‌لیتر محلول رادیکال DPPH اضافه شد و جذب به‌وسیله اسپکتروفتومتر در فواصل زمانی ۵ دقیقه‌ای در طول موج

نتایج

میزان رطوبت و فعالیت آبی یا aw

میزان رطوبت ۷/۵ درصد و فعالیت آبی 0.32 ± 0.02 بود.

خصوصیات میکروکپسول‌ها

خروجی دستگاه آنالیز اندازه ذرات نشان داد که قطر متوسط میکروکپسول‌ها در محصول خشک کن انجمادی نهایی 1.62 ± 0.47 میکرومتر (میانگین $ST^1 \pm$) است. مشاهدات میکروسکوپ الکترونی، کپسول‌های نسبتاً مشابه و گرد را در محصول نهایی نشان داد (شکل ۱، A و B). مشاهده SEM نشان داد که باکتری *L. plantarum* با ژلاتین-پروتئین هیدرولیز شده ماهی به طور موفقیت‌آمیزی کپسوله شده و کپسول‌های تولیدی عمدتاً کروی و بیضوی شکل بودند (شکل ۱، C و D).

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد 2 و 2 دیفنیل-1-

پیکربل هیدرازیل (DPPH)

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان فعالیت رادیکال آزاد DPPH (شکل ۲) با افزایش غلظت افزایش می‌یابد ($p < 0.05$). لاکتو باسیلوس ریزپوشانی شده دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی $25/33\%$ در غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود و میزان فعالیت رادیکال آزاد DPPH در این غلظت تفاوت معنی‌داری با آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHA داشت ($p < 0.05$).

ارزیابی قدرت کاهش‌دهندگی آهن (FRAP)

در آزمون FRAP نیز نتایج مشابهی مشاهده شد. ظرفیت احیاء آهن (Fe^{2+} به Fe^{3+}) با افزایش غلظت نمونه افزایش یافت به طوری که بیشترین فعالیت در غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر برابر با $5.187 \mu\text{mol } Fe^{2+}/g$ بود ($p < 0.05$). در مقایسه، مقدار FRAP در BHA (آنتی‌اکسیدان شیمیایی) در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر برابر $10.15 Fe^{2+}/g$ بود که نشان‌دهنده توان احیایی بسیار بالای BHA است (شکل ۳) ($p < 0.05$).

۵۱۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. کالیبراسیون در محدوده ۳۰-۵ دقیقه انجام شد. فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از فرمول ذیل محاسبه گردید (Dadmehr et al., 2024):

$$RSA\% = (1 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}))$$

A_{sample} : جذب نمونه آزمایش شده، A_{blank} : جذب نمونه بلانک است (مخلوط حلال به جای محلول نمونه با محلول رادیکال DPPH مخلوط شد)

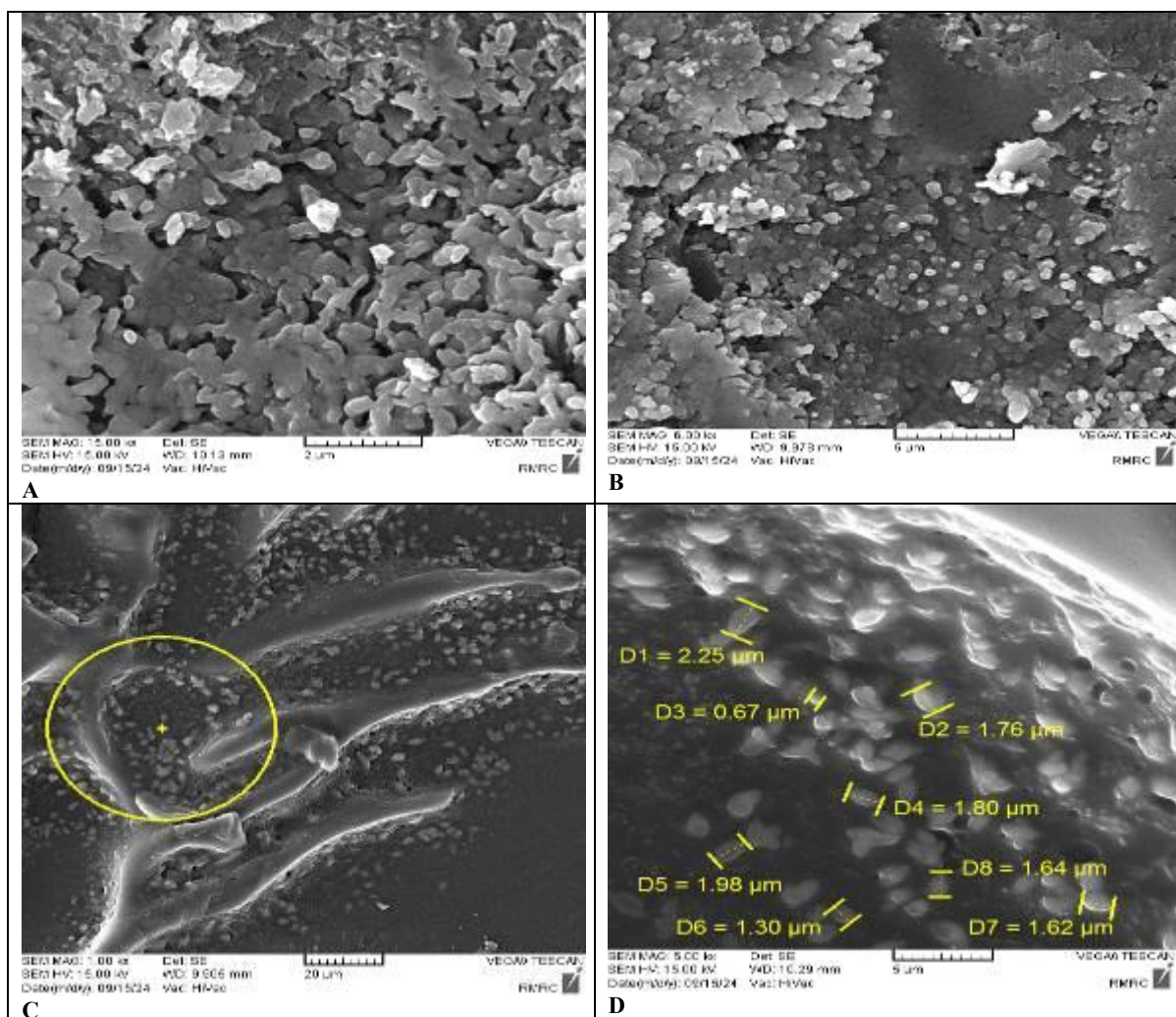
قدرت احیاء‌کنندگی فریک *L. plantarum* ریزپوشانی شده

قدرت آنتی‌اکسیدانی پروبیوتیک‌ها از طریق سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی احیاءکننده فریک (FRAP) همان‌طوری که در مطالعه Dadmehr و همکاران (۲۰۲۴) شرح داده شده، تعیین شد. معرف FRAP از طریق مخلوط کردن بافر استات (300 میلی‌مولار)، TPTZ (10 نانومولار در HCl 40 میلی‌مولار) و $FeCl_3$ (20 میلی‌مولار) با نسبت $10:1:1$ ($u/v/v$) تهیه و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس 100 میکرولیتر از نمونه‌ها به 3 میلی‌لیتر از معرف‌های FRAP اضافه شد و جذب در طول موج 593 نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی کالیبراسیون در محدوده ۳۰-۵ دقیقه رسم شد. برای مقایسه، BHA نیز تحت شرایط مشابه یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی استاندارد آزمایش شد (Dadmehr et al., 2024).

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

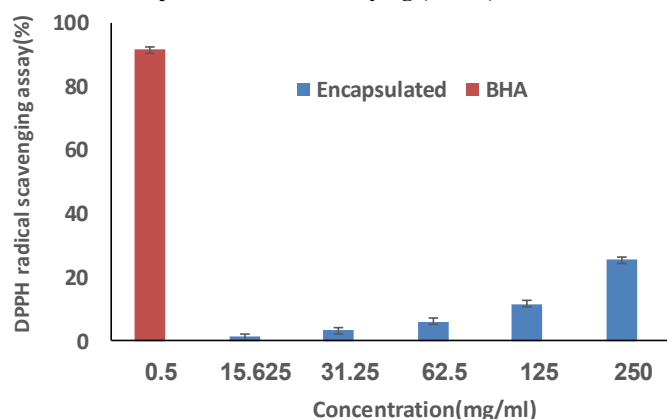
تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و نتایج ثبت گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. میانگین مقادیر و انحراف معیار در نرم افزار Excel محاسبه شد. از نرم افزار آماری SPSS نسخه 18 برای آنالیز داده‌ها و از نرم افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

¹ - Standard deviation

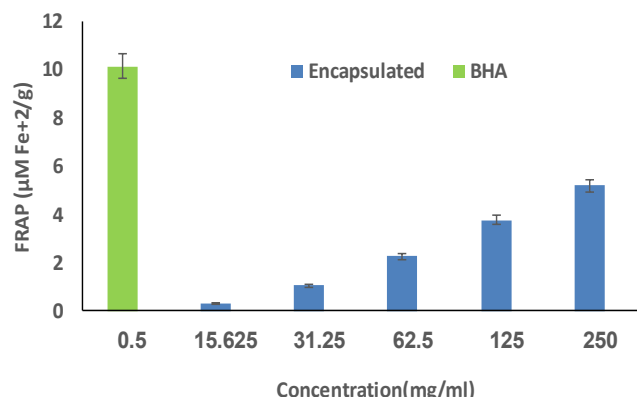


شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM از *Lactobacillus plantarum* ریزپوشانی شده با ژلاتین-پروتئین هیدرولیز شده ماهی از طریق خشک‌کن انجمادی ($2000\times$)

Figure 1: SEM electron microscope image of *Lactobacillus plantarum* microencapsulated with gelatin-hydrolyzed fish protein via freeze-drying ($2000\times$)



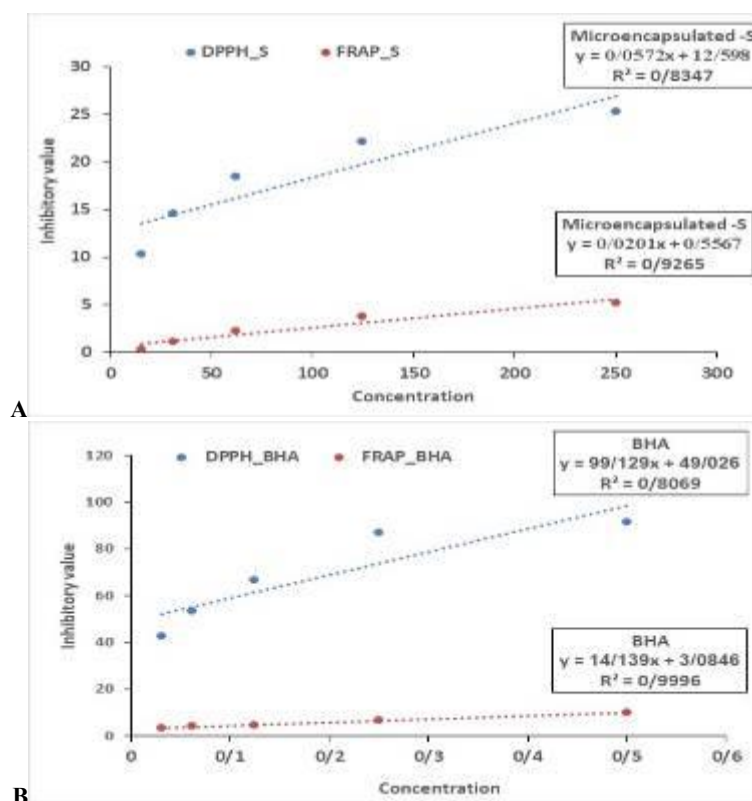
شکل ۲: فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH پوشش‌های *Lactobacillus plantarum* ریزپوشانی شده
Figure 2: DPPH antioxidant activity of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* coatings



شکل ۳: فعالیت آنتی اکسیدانی FRAP پوشش‌های *Lactobacillus plantarum* ریزپوشانی شده
Figure 3: FRAP antioxidant activity of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* coatings

همبستگی بین غلظت و FRAP نشان می‌دهد که مقادیر FRAP نیز به طور منظم با افزایش غلظت افزایش یافته‌اند که نشانگر همبستگی مثبت قوی است. توان احیاءکنندگی نمونه‌ها در غلظت‌های بالا بیشتر بوده که بیانگر پتانسیل آنتی اکسیدانی قوی‌تر در دوزهای بالاتر است (شکل ۴-۱) ($p < 0.05$).

همبستگی بین غلظت و DPPH روند افزایشی واضحی را نشان می‌دهد. با افزایش غلظت نمونه، درصد حذف رادیکال‌های آزاد (DPPH) نیز افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده همبستگی مثبت قوی بین غلظت و فعالیت آنتی اکسیدانی بر اساس آزمون DPPH است ($p < 0.05$).



شکل ۴: نمودار همبستگی بین DPPH و فعالیت کاهندگی (A) *Lactobacillus plantarum* ریزپوشانی شده (B) BHA
Figure 4: Correlation diagram between DPPH and reducing activity of a) *Lactobacillus plantarum* encapsulated b) BHA

هستند و سطح آنها بافتی متراکم و بدون ترک را نشان می‌دهد. این ویژگی‌ها بیانگر یکپارچگی ساختاری پوشش ایجادشده و پتانسیل بالای آن در محافظت مکانیکی از *L. plantarum* است. در شکل ۱ (C) ذراتی با سطحی صاف‌تر و کروی‌تر دیده می‌شوند. ساختار صاف و یکنواخت معمولاً حاصل انجماد کنترل‌شده و توزیع همگن بستر اطراف سلول‌هاست. این موضوع نشان می‌دهد که سیستم مورد استفاده، محیطی پایدار برای محصورسازی میکروارگانیسم‌ها فراهم کرده است (Anal and Singh, 2007). شکل ۱ (D) که در بزرگ‌نمایی بیشتری تهیه شده، نمای نزدیکی از سطح ذرات را نمایش می‌دهد و وجود چروکیدگی‌های سطحی جزئی را تأیید می‌کند. این چروک‌ها معمولاً نتیجه تبخیر سریع حلال طی فرآیند خشک‌کردن انجمادی هستند و ممکن است به کاهش میزان تماس با رطوبت یا اکسیژن کمک کنند (Corcoran et al., 2006). با این حال، هیچ‌گونه ترک یا شکست ساختاری قابل توجه در سطح ذرات مشاهده نگردید که نشان‌دهنده استحکام خوب پوشش و چسبندگی مناسب اجزاء بستر است. مشاهدات حاصله از تصاویر SEM نشان می‌دهد که فرمولاسیون ژلاتین-پروتئین هیدرولیز شده به عنوان حامل پروبیوتیک، از نظر کارایی مناسب است و تأثیر مثبتی در ایجاد ساختاری پایدار و مؤثر در حفاظت از سلول‌های باکتریایی دارد.

تأیید شده است که پایداری پروبیوتیک‌ها در شرایط اکسیداسیون کاهش می‌یابد. بنابراین، استفاده از عوامل دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به افزایش بقاء پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده کمک کند (Dadmehr et al., 2024). ترکیبات حاصل از هیدرولیز پروتئین، با توجه به نوع پروتئین اولیه و روش هیدرولیز، می‌توانند شامل اسیدهای آمینه آزاد، پپتیدهای کوچک و در برخی موارد، مولکول‌های بزرگتر پروتئینی باقی‌مانده باشند (Ramezani et al., 2018). ژلاتین و پپتیدهای زیست فعال به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی گزارش شده‌اند (Yaghoubzadeh et al., 2019; Nurilmala et al., 2020). فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژلاتین ناشی از پپتیدهای آن است که حاوی مقادیر زیادی آرژنین، تیروزین و فنیل آلانین هستند و تصور می‌شود دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری

افزایش غلظت BHA، درصد حذف رادیکال‌های آزاد (DPPH) به طور منظم افزایش یافته است. افزایش از ۴۲٪/۷ در پایین‌ترین غلظت به بیش از ۹۱٪ در بالاترین غلظت، نشان‌دهنده همبستگی بسیار قوی و مثبت بین غلظت و قدرت رادیکال‌زدایی است ($p < 0.05$). FRAP نیز روند افزایشی منظم و قوی دارد (از ۳/۵۱ به ۱۰/۱۵ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) که بیانگر توان بالای احیاءکنندگی BHA است (شکل ۴-B) ($p < 0.05$).

بحث

نتایج نشان داد که دیواره ریزپوشانی‌شده حاوی لاکتوباسیلوس با ترکیب ژلاتین و پروتئین هیدرولیز شده دارای رطوبت ۷/۵٪ و فعالیت آبی 0.32 ± 0.02 است که پایداری فیزیکی و ماندگاری مناسب سیستم را نشان می‌دهد. مقدار پایین فعالیت آبی که مانع رشد میکروارگانیسم‌های ناخواسته و تخریب‌های شیمیایی می‌شود، نقش مهمی در حفاظت از پروبیوتیک‌ها دارد. رطوبت کم نیز از شکنندگی ساختار جلوگیری می‌کند (Hasniah, 2022). استفاده از ژلاتین و پروتئین هیدرولیز شده باعث ایجاد بستری مقاوم و کنترل‌شده در نگهداری شده است (Mushtaq et al., 2022). یکی از عوامل کلیدی در پایداری و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک از جمله *L. plantarum*، میزان رطوبت باقیمانده و فعالیت آبی آنها پس از فرآیند خشک‌سازی است. رطوبت بالا در محصولات حاوی پروبیوتیک می‌تواند منجر به کاهش زنده‌مانی سلول‌ها، رشد میکروارگانیسم‌های ناخواسته و کاهش زمان ماندگاری شود. در مقابل، فعالیت آبی پایین به پایداری بهتر باکتری طی نگهداری و شرایط نامطلوب کمک می‌کند. مطالعات پایداری ذخیره‌سازی نشان داد که با کاهش فعالیت آبی و دما، بقاء سلول‌های کپسوله‌شده خشک‌شده افزایش می‌یابد (Albadran et al., 2015).

بررسی ساختار سطحی ذرات ریزپوشانی‌شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان‌دهنده موفقیت در فرآیند ریزپوشانی با ترکیب ژلاتین و پروتئین هیدرولیز شده ماهی بود. همان‌طوری‌که در شکل ۱ (A و B) مشاهده می‌شود، ذرات دارای ساختاری نسبتاً یکنواخت و کروی

مختلف شد (Wang et al., 2019). در مطالعه Cui و همکاران (۲۰۲۱) استفاده از پپتیدهای مشتق از منابع دریایی در پوشش میکروکپسول‌ها منجر به بهبود قابل توجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در آزمون‌های DPPH و ABTS شد (Cui et al., 2021). آنها این اثر را به حضور گروه‌های فعال آمینی و هیدروفلوب در ترکیب پوشش نسبت دادند. Rizvi و همکاران گزارش کردند که پوشش‌دهی *L. plantarum* با صمغ عربی و آلژینات باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد، اما میزان این افزایش نسبت به پوشش‌های پروتئینی نظیر ژلاتین و FPH کمتر بود (Razavi et al., 2020). همچنین Hebert و همکاران (۲۰۱۷) به اثرات سینرژیک بین باکتری‌های پروبیوتیک و پپتیدهای زیست‌فعال دریایی اشاره کردند که منجر به ارتقاء عملکردهای زیستی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Hebert et al., 2017). نتایج این تحقیق با مطالعه Wang و همکاران (۲۰۱۹) هم‌خوانی دارد که نشان دادند، ریزپوشانی با ژلاتین می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی *L. plantarum* را به صورت معنی‌داری افزایش دهد. همچنین گزارش Cui و همکاران (۲۰۲۱) بیان کردند که ترکیب پپتیدهای دریایی با باکتری‌های پروبیوتیک منجر به پتانسیل بالای احیاء آهن (Fe^{3+}) و تقویت عملکرد آنتی‌اکسیدانی می‌شود که با نتایج آزمون FRAP مطابقت دارد. علاوه‌براین، در مطالعه Razavi و همکاران (۲۰۲۰) که به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی *L. plantarum* ریزپوشانی‌شده با صمغ عربی و آلژینات پرداخت، افزایش دوز وابسته FRAP را تأیید نمودند. با این‌حال، قدرت کاهش‌دهندگی در مقایسه با پوشش‌های پروتئینی مانند ژلاتین و پروتئین هیدرولیز شده ماهی کمتر گزارش شد. این موضوع را می‌توان به حضور گروه‌های عاملی احیاء‌کننده در پپتیدهای حاصل از منابع پروتئینی نسبت داد که نقش مهمی در انتقال الکترون در آزمون FRAP دارند (Hebert et al., 2017). همبستگی بین غلظت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌های DPPH و FRAP نشان داد که در هر دو گروه نمونه، افزایش غلظت منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد. نمونه‌های ریزپوشانی‌شده *L. plantarum*، با افزایش غلظت در دامنه

باشند (Shiao et al., 2021). این پوشش‌ها ممکن است فعالیت آنتی‌اکسیدانی *L. plantarum* ریزپوشانی‌شده را افزایش دهد. این پوشش‌ها می‌توانند موجب تقویت فعالیت آنتی‌اکسیدانی *L. plantarum* ریزپوشانی‌شده شوند. نتایج حاصل از آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی نشان داد که با افزایش غلظت، به طور معناداری میزان رادیکال‌زدایی و قدرت احیاء نمونه‌های ریزپوشانی‌شده نیز افزایش می‌یابد. در آزمون DPPH، درصد مهار رادیکال‌های آزاد از ۱۰/۲۵٪ در غلظت ۱۵/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۲۵/۳۳٪ در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزایش یافت. به همین ترتیب، در آزمون FRAP، قدرت احیاء نمونه‌ها از ۰/۲۹۷ میکرومول آهن دو ظرفیتی بر گرم در پایین‌ترین غلظت، به ۵/۱۸۷ میکرومول بر گرم در بالاترین غلظت رسید. این روند افزایشی وابسته به دوز، نشان‌دهنده وجود ترکیبات زیست‌فعال با خاصیت آنتی‌اکسیدانی در ترکیب پوشش‌دهنده است. پروتئین‌های هیدرولیز‌شده ماهی غنی از پپتیدهای دارای گروه‌های عاملی ($-NH_2$ و $-COOH$) هستند که می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش دهند (Harnedy and FitzGerald, 2012).

علاوه‌برآن، ساختار ژلاتینی بستر نیز ممکن است در پایداری ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نقش داشته باشد (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). نتایج آزمون‌ها با پژوهش‌های مشابه هم‌خوانی دارند. برای مثال، Wang و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای مشابه نشان دادند که میکروکپسول‌های حاوی پروبیوتیک با پوشش پپتیدی، فعالیت DPPH و FRAP بیشتری در غلظت‌های بالاتر نشان می‌دهند. همچنین در مطالعه Mehdipour Biregani و Ahari (۲۰۲۱) پروتئین هیدرولیز شده حاصل از پروتئین ماهی دارای توان بالایی در جذب رادیکال‌های آزاد بودند. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهند که سیستم ریزپوشانی توسعه‌یافته نه تنها موجب افزایش پایداری *L. plantarum* می‌شوند، بلکه با فراهم کردن خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجه، می‌تواند به عنوان حامل زیست‌فعال در محصولات عملکردی کاربرد داشته باشد. Wang و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که ریزپوشانی *L. plantarum* با ژلاتین سبب افزایش پایداری و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن در شرایط

- Charalampopoulos, D., 2015.** Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. *Food Research International*, 74:208-216.
DOI:10.1016/j.foodres.2015.05.016
- Anal, A.K. and Singh, H., 2007.** Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18(5): 240-251.
DOI:10.1016/j.tifs.2007.01.004
- Arepally, D. and Goswami, T.K., 2019.** Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *Learning with Technologies*, 99:583-593. DOI:10.1016/j.lwt.2018.10.022
- Bastos, B.M., Farias, B.S., Casati, M.O., Engelmann, J.I., Moura, J.M. and Pinto, L.A., 2021.** Gelatin films from carp skin crosslinked by gallic acid and incorporated with chitosan/tuna lipid fractions. *Journal of Polymers and the Environment*, 29(7):2096-2110. DOI:10.1007/s10924-020-01995-2
- Collantes, M., Peñuelas-Sanchez, I., González-Ferrero, C., Brotons-Canto, A., Gonzalez-Navarro, C.J., Gamazo, C., López, A., Peñalva, R., Vitas, A.I., Virto-Resano, R. and Irache, J.M., 2023.** Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* in casein-chitosan microparticles facilitates the arrival to the colon and develops an immunomodulatory effect. *Food Hydrocolloids*, 136:108213.
DOI:10.1016/j.foodhyd.2022.108213
- ۶۲۵-۱۵/۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر، میزان مهار رادیکال های آزاد (DPPH) از ۱۰/۲۵٪ به ۲۵/۳۳٪ و توان احیاء (FRAP) از ۰/۲۹۷ به ۵/۱۸۷ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ افزایش یافت که بیانگر پتانسیل پپتیدهای زیست فعال موجود در بستر پوششی (ژلاتین-پروتئین هیدرولیز شده ماهی) در افزایش اثرات آنتی اکسیدانی است که احتمالاً ناشی از توانایی آنها در اهدا الکترون و مهار رادیکال های آزاد است. نمونه های حاوی آنتی اکسیدان سنتتیک BHA، فعالیت آنتی اکسیدانی بسیار قوی تر و با شیب تندتری نسبت به افزایش غلظت نشان دادند. نمونه های زیستی در دوزهای بالا اثر آنتی اکسیدانی مناسبی داشتند، اما نسبت به BHA به ویژه در دوزهای پایین، عملکرد ضعیف تری نشان دادند. با این حال، به دلیل طبیعی و ایمن بودن، می توان از آنها به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی اکسیدان های سنتتیک در صنایع غذایی و دارویی استفاده کرد.
- در مطالعه حاضر نیز کاهش فعالیت آبی در اثر استفاده از ترکیب ژلاتین و پروتئین های هیدرولیز شده قزل آلائی رنگین کمان می تواند به ایجاد یک محیط محدود کننده برای واکنش های تخریبی (اکسیداسیون و تخریب آنزیمی) کمک کند که با نتایج مطالعات پیشین مطابقت دارد. ریزپوشانی *L. plantarum* با ترکیب ژلاتین و پروتئین هیدرولیز شده ماهی از طریق تعاملات شیمیایی با رادیکال ها و یون های فلزی، نقش مؤثری در تقویت خاصیت آنتی اکسیدانی ایفاء می کند. این ویژگی، امکان استفاده از این ترکیب را در صنایع غذایی و دارویی به عنوان جایگزینی طبیعی و ایمن برای آنتی اکسیدان های مصنوعی نظیر BHA فراهم می آورد. همبستگی مثبت و معنادار بین غلظت و فعالیت آنتی اکسیدانی، در هر دو گروه مشهود بود در حالی که BHA در دوزهای پایین نیز اثربخشی بالایی دارد، نمونه های زیستی نیاز به غلظت های بالاتری دارند، اما می توانند جایگزین مناسبی با پتانسیل آنتی اکسیدانی مطلوب و ایمنی بالاتر باشند.

منابع

Albadran, H.A., Chatzifragkou, A., Khutoryanskiy, V.V. and

- Corcoran, B., Stanton, C., Miao, S., Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P., 2006.** Viability of probiotic bacteria as affected by drying. *Water Properties of Food, Pharmaceutical, and Biological Materials*, edited by Maria del Pilar Buera, Jorge Welti-Chanes, Peter J. Lillford, Horacio R. Corti. 233-247.
- Cui, Y., Zhang, L., Zhang, T., Zhou, Y. and Yang, L., 2021.** Effect of marine-derived peptides on the antioxidant capacity and survivability of microencapsulated *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry*, 343:128523. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128523
- Dadmehr, M. and Mansouri, R. and Korouzhdehi, B., 2024.** Encapsulation of probiotics using gelatin and sodium phytate for improvement of viability and antioxidant capacity in gastrointestinal condition. *Food Bioscience*, 62:105550. DOI:10.1016/j.fbio.2024.105550
- Fraj, J., Petrović, L., Đekić, L., Budinčić, J.M., Bučko, S. and Katona, J., 2021.** Encapsulation and release of vitamin C in double W/O/W emulsions followed by complex coacervation in gelatin-sodium caseinate system. *Journal of Food Engineering*, 292:110353. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2020.110353
- González-Serrano, D.J., Hadidi, M., Varcheh, M., Jelyani, A.Z., Moreno, A. and Lorenzo, J.M., 2022.** Bioactive peptide fractions from collagen hydrolysate of common carp fish byproduct: Antioxidant and functional properties. *Antioxidants*, 11(3):509. DOI:10.3390/antiox11030509
- Guerard, F., Guimas, L. and Binet, A., 2002.** Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19:489-498. DOI:10.1016/S1381-1177(02)00203-5
- Guo, H., Zhou, Y., Xie, Q., Chen, H., Zhang, Y., Hong, Z., Chen, S. and Zhang, M.E., 2024.** Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* with improved survivability using pufferfish skin gelatin-based wall materials. *Marine Drugs*, 22(3):124. DOI:10.3390/md22030124
- Harnedy, P.A. and FitzGerald, R.J., 2012.** Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1):6-24. DOI:10.1016/j.jff.2011.09.001
- Hasniah, N., 2022.** Impact of calcium ion (Ca^{2+}) on pectin wall material for microencapsulated *Lactobacillus plantarum*. Thesis. Master of Science. Chulalongkorn University. 74 P. DOI:10.58837/CHULA.THE.2022.1219
- Hebert, E.M., Raya, R.R. and Savoy de Giori, G., 2017.** Enhancement of functional properties of probiotic bacteria through co-encapsulation with bioactive peptides: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 66:93-102. DOI:10.1016/j.tifs.2017.06.002
- Heinzelmann, K., Franke, K., Jensen, B. and Haahr, A.M., 2000.** Protection of fish oil from oxidation by microencapsulation using freeze-drying techniques. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102(2):114-121. DOI:10.1002/(SICI)1438-9312(200002)102:2

- Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A., 2000.** Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1):43-81. DOI:10.1080/10408690091189266
- Kulawik, A., Cielecka-Piontek, J. and Zalewski, P., 2023.** The importance of antioxidant activity for the health-promoting effect of lycopene. *Nutrients*, 15(17):3821. DOI:10.3390/nu15173821
- Luca, L. and Oroian, M., 2021.** Influence of different prebiotics on viability of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* encapsulated in alginate microcapsules. *Foods*, 10(4):710. DOI:10.3390/foods10040710
- Machado, A.R., Silva, P.M., Vicente, A.A., Souza-Soares, L.A., Pinheiro, A.C. and Cerqueira, M.A., 2022.** Alginate particles for encapsulation of phenolic extract from *Spirulina* sp. LEB-18: physicochemical characterization and assessment of *in vitro* gastrointestinal behavior. *Polymers*, 14(21):4759. DOI:10.3390/polym14214759
- Mehdipour Biregani, Z. and Ahari, H., 2021.** Effect of alcalase-mediated hydrolysis on the free radical scavenging activity and reducing power of whey protein isolate. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*, 4(1):58-62. DOI:10.22059/jfabe.2021.317538.1081
- Mushtaq, F., Raza, Z.A., Batool, S.R., Zahid, M., Onder, O.C., Rafique, A. and Nazeer, M.A., 2022.** Preparation, properties, and applications of gelatin-based hydrogels (GHs) in the environmental, technological, and biomedical sectors. *International Journal of Biological Macromolecules*, 218:601-633. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.07.168
- Nemati, M., Shahosseini, S.R. and Ariaii, P., 2024.** Review of fish protein hydrolysates: production methods, antioxidant and antimicrobial activity and nanoencapsulation. *Food Science and Biotechnology*, 33(8):1789-1803. DOI:10.1007/s10068-024-01554-8
- Nurilmala, M., Hizbullah, H.H., Karnia, E., Kusumaningtyas, E. and Ochiai, Y., 2020.** Characterization and antioxidant activity of collagen, gelatin, and the derived peptides from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin. *Marine drugs*, 18(2):98. DOI:10.3390/md18020098
- Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. and Hosseini, S.M.H., 2012.** Investigation of antibacterial activity cinnamon bark essential oil (*Cinnamomum zeylanicum*) in vitro antibacterial activity against five food spoilage bacteria. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 9(35):67-76
- Ozdemir, N., Bayrak, A., Tat, T., Altay, F., Kiralan, M. and Kurt, A., 2021.** Microencapsulation of basil essential oil: Utilization of gum arabic/whey protein isolate/maltodextrin combinations for encapsulation efficiency and *in vitro* release. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15:1865-1876. DOI:10.1007/s11694-020-00771-z
- Pramono, Y.B., Legowo, A.M., Hintono, A., Setiani, B.E., Nabila, A.Z. and Handoko, N.R.K., 2025.** Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* with Kepok banana flour through microbiology and physics parameters. IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 1460(1):012062. DOI:10.1088/1755-1315/1460/1/012062

- Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G.S. and Anandharamakrishnan, C.J.J.O.F.F., 2012.** Effect of whey protein-alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 4(4):891-898. DOI:10.1016/j.jff.2012.06.006
- Ramezani, Z., Rajabzadeh Qatrami, E. and Hosseini, S.F., 2018.** The effect of hydrolysis intensity on functional properties of hydrolyzed protein of orange-finned fish (*Leiognathus bindus*), *Journal of Food Processing and Preservation*, 10(2):137-149. DOI:10.22069/ejfp.2019.12119.1382
- Ranadheera, R.D.C.S., Baines, S.K. and Adams, M.C., 2010.** Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1):1-7. DOI:10.1016/j.foodres.2009.09.009
- Razavi, R., Tashakkori, M. and Yousefi, M., 2020.** Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* with Arabic gum and alginate and its antioxidant activity in dairy beverage. *Journal of Functional Foods*, 72:104062. DOI:10.1016/j.jff.2020.104062
- Shahidi, F. and Ambigaipalan, P., 2015.** Novel functional food ingredients from marine sources. *Current Opinion in Food Science*, 2, 123-129. DOI:10.1016/j.cofs.2014.12.009
- Shiao, W.C., Wu, T.C., Kuo, C.H., Tsai, Y.H., Tsai, M.L., Hong, Y.H. and Huang, C.Y., 2021.** Physicochemical and antioxidant properties of gelatin and gelatin hydrolysates obtained from extrusion-pretreated fish (*Oreochromis* sp.) scales. *Marine Drugs*, 19(5):275. DOI:10.3390/md19050275
- Shori, A.B., 2017.** Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(1):1-5. DOI:10.1016/j.hjb.2016.12.008
- Tamara, T., 2024.** Viability and Survival of *Lactobacillus casei* encapsulated with whey, sucrose and maltodextrin using freeze-dried technique. *Indonesian Journal of Applied Research (IJAR)*, 5(2):134-146. DOI:10.30997/ijar.v5i2.498
- Vaziri, A.S., Alemzadeh, I., Vossoughi, M. and Khorasani, A.C., 2018.** Co-microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* and DHA fatty acid in alginate-pectin-gelatin biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 199:266-275. DOI:10.1016/j.carbpol.2018.07.002
- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z. and Xiao, P., 2019.** Protective effects of gelatin-based microencapsulation on *Lactobacillus plantarum* and its antioxidant activity in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132:1162-1170. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.195
- Yaghoobzadeh, Z., Kaboosi, H., Peyravii Ghadikolaii, F., Safari, R. and Fattahi E., 2019.** Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin protein hydrolysate. *Iranian Fisheries Scientific Journal*, 28(2):117-128. DOI:10.22092/ISFJ.2019.119049 (In Persian)