# Cryoprotective Effect of *Vicia ervilia* Seed Protein Isolate on the Viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5

Vida Gholifar[1], Reza Rezaei Mokarram[1], Mahmood Sowti Khiabani[1], **Soheila Zarringhalami[2]***

[1] Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2] Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan

**Received Date:2025.12.14 Accepted Date:2026.05.01**

**Abstract**

With the advancement of biotechnological approaches and the rapid growth of the food and pharmaceutical industries, along with the well-documented health benefits of probiotics, the role of these microorganisms in the development of functional foods and dietary supplements has attracted increasing attention in recent years. Nevertheless, maintaining probiotic viability throughout processing, particularly during freeze-drying and subsequent storage, remains one of the major challenges in the commercial production of probiotic-based products. Accordingly, the aim of the present study was to investigate the potential application of bitter vetch (*Vicia ervilia*) seed protein isolate as a cryoprotective agent at concentrations of 1, 5, and 10% on the viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 during freeze-drying and storage for 42 days at 4 °C, in comparison with skim milk as the control. The lyophilized samples were also structurally characterized using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), and scanning electron microscopy (SEM). The results demonstrated that the formulation containing 10% bitter vetch seed protein isolate exhibited a more compact and protective microstructure than skim milk for bacterial cells and significantly improved the survival of *L. acidophilus* La-5 even at the end of the storage period ($4 \times 10^7$ CFU/mL versus $9 \times 10^4$ CFU/mL for the control) ($p < 0.05$). Overall, these findings indicate that bitter vetch seed protein isolate at a concentration of 10% can serve as an effective, natural, and biocompatible cryoprotectant, representing a promising alternative to conventional compounds commonly used in probiotic preservation formulations.

**Keywords:** *Vicia ervilia* protein isolate; freeze-drying; skim milk; *Lactobacillus acidophilus* LA-5; cryoprotection

* zaringhalami@znu.ac.ir

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

**EXTENDED ABSTRACT**

**Introduction**

Probiotic preservation during industrial-scale processing remains a major challenge in functional food development, especially when utilizing freeze-drying (lyophilization) for storage and delivery. Freeze-drying, while effective in prolonging shelf life, often causes substantial damage to probiotic cells due to ice crystal formation and dehydration stress. The use of cryoprotective agents is thus critical to ensure cellular integrity and viability. Traditionally, dairy-based protectants such as skimmed milk and whey protein have been used due to their high protein and sugar contents. However, growing interest in plant-based, cost-effective, and sustainable ingredients has prompted the exploration of novel natural cryoprotectants. *Vicia ervilia* (bitter vetch), a legume native to the Mediterranean basin, is rich in protein and bioactive compounds, and has recently garnered attention for its potential functional applications. This study investigates and compares the cryoprotective efficacy of *Viciaervilia* seed protein isolate (VSPI) and skimmed milk (SM) on the viability of *Lactobacillus acidophilus* LA5 during and after freeze-drying.

**Materials and Methods**

*Vicia ervilia* seeds were processed to extract protein using isoelectric precipitation, which was found to yield the highest extraction efficiency based on prior studies. Three concentrations of VSPI (1%, 5%, and 10% w/v) were prepared and used as cryoprotectants. Skimmed milk served as the control due to its industrial relevance. The probiotic strain *L. acidophilus* LA5 was mixed with each cryoprotectant, then subjected to freeze-drying. To analyze chemical functionality, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was conducted on the freeze-dried powders. X-ray diffraction (XRD) was employed to assess crystalline or amorphous structure. Scanning electron microscopy (SEM) provided morphological observations of the protective matrix surrounding probiotic cells. Viability was measured at intervals (5, 21, and 42day) using plate counting and expressed as CFU/mL.

**Results**

FTIR analysis of VP revealed clear amide I (1654 $cm^{-1}$), amide II (1541 $cm^{-1}$), and amide III (1245 and 1169 $cm^{-1}$) bands, indicating a well-maintained peptide structure. A broad peak at 3424 $cm^{-1}$ suggested active –OH and $–NH_2$ groups capable of hydrogen bonding. Similarly, SM exhibited functional groups relevant to cryoprotection, though the peaks were less intense. XRD patterns of VS PI showed broad peaks in the 2θ range of 15–35°, characteristic of amorphous or semi-crystalline matrices, whereas SM showed multiple sharp peaks, including at $2\theta \approx 20°$, indicative of a more crystalline phase. These structural differences suggest superior flexibility and mechanical protection in the VS PI matrix. SEM imaging supported these findings: VSPI-treated samples showed a smooth, dense surface without cracks, while SM-treated cells exhibited brittle, fragmented surfaces.

**Discussion**

Viability results indicated that VS PI had a concentration-dependent protective effect. At day 5, all samples had comparable viability (approx. $1 \times 10^8$ CFU/mL). However, by day 42, a clear divergence was observed: SM-treated samples declined to $13 \times 10^6$ CFU/mL, whereas 10% VSPI maintained $4 \times 10^7$ CFU/mL. These findings confirm that VS PI at 10% concentration offers significantly greater cryoprotection. The improved performance is likely due to the protein's ability to form stable, flexible matrices that minimize mechanical damage, preserve membrane integrity, and suppress ice crystallization near cell membranes. The amorphous structure observed via XRD further supports this hypothesis, as it is known to provide superior protection under freeze-drying conditions compared to crystalline structures. Previous research with plant proteins such as soy, rice, and pea supports these outcomes, highlighting that molecular weight alone does not determine protective capacity rather, protein structure, functional groups, and matrix formation are crucial factors.

**Conclusion**

The study demonstrates that VSPI particularly at 10% concentration, is a highly effective natural cryoprotectant for preserving *L. acidophilus* LA5 during freeze-drying and storage time. Its functional groups, amorphous matrix-forming ability, and morphological properties enable it to outperform conventional dairy-based protectants such as deproteinized whey, especially in long-term storage. These findings suggest that VSPI can be a promising plant-based alternative in the formulation of probiotic products, aligning with current trends toward clean-label and vegan-friendly functional foods. Future studies should investigate the scalability, sensory effects, and compatibility of VSPI in real food matrices.

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

# اثرمحافظت انجمادی ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه (*Vicia ervilia*) بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5

ویدا قلی‌فر[۱]، رضا رضایی‌مکرم[۱]، محمود صوتی خیابانی[۱]، **سهیلا زرین‌قلمی**[۲*]

[۱] گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۲] گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

**تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۲۰**

## چکیده

با پیشرفت فناوری‌های زیستی و رشد صنایع غذایی و دارویی و همچنین اثرات سودمند به اثبات رسیده‌ی پروبیوتیک‌ها بر سلامت انسان، در سال‌های اخیر، نقش این میکروارگانیسم‌ها در تولید مواد غذایی و مکمل‌های دارویی مختلف، توجه روزافزونی را به خود جلب کرده است. اما در این میان، حفظ زنده‌مانی در طول فرآیند آماده‌سازی پروبیوتیک‌ها، به ویژه به روش خشک‌کردن و نگهداری آن‌ها، همواره یکی از چالش‌های اساسی تجاری‌سازی است. بنابراین، در پژوهش حاضر، بررسی امکان استفاده از ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه (*Vicia ervilia*) به‌عنوان عامل محافظت انجمادی در مقادیر ۱، ۵ و ۱۰ درصد در مقایسه با شیر پس چرخ (شاهد)، در زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 طی فرآیند خشک‌کردن انجمادی و نگهداری به مدت ۴۲ روز دردمای ۴ °C مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های خشک شده، از نظر ویژگی‌های ساختاری نیز با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)، پراش اشعه ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که نمونه‌ی حاوی ۱۰ درصد ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه ساختار منسجم‌تری از شیر پس‌چرخ جهت حفظ باکتری‌ها دارد و حتی در پایان دوره نگهداری، به‌طور معناداری ($۴ \times ۱۰^{۷}$ CFU/mL) نسبت به شیر پس‌چرخ ($۹ \times ۱۰^{۴}$ CFU/mL) عملکرد بهتری در زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 دارد ($p<0.05$). به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه در غلظت ۱۰ درصد، می‌تواند به‌عنوان یک عامل محافظ انجمادی مؤثر، طبیعی و زیست‌سازگار، جایگزین ترکیبات رایج مورد استفاده در نگهداری پروبیوتیک‌ها، مورد استفاده قرارگیرد.

**کلید واژه‌ها:** ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه، خشک‌کردن انجمادی، شیر پس‌چرخ، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5، محافظت انجمادی

* zaringhalami@znu.ac.ir

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

## مقدمه

در سال‌های اخیر، نقش میکروارگانیسم‌های مفید، به‌ویژه پروبیوتیک‌ها، در ارتقاء سلامت انسان توجه روزافزونی را به خود جلب کرده است. طبق تعریف مشترک سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحدو سازمان بهداشت جهانی [1]، "پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به میزان کافی، برای میزبان اثرات سودمند دارند"(۱). این باکتری‌ها از طریق تنظیم تعادل میکروبی روده، تقویت پاسخ ایمنی، افزایش جذب مواد مغذی و کاهش خطر بیماری‌های مزمن نظیر دیابت، سرطان و اختلالات گوارشی نقش مؤثری در بدن میزبان ایفا می‌کنند (۲، ۳). در گذشته، استفاده از پروبیوتیک‌ها بیشتر به تخمیر در محصولات لبنی محدود می‌شد؛ اما با پیشرفت فناوری‌های زیستی و رشد صنعت غذاهای فراسودمند، کاربرد آن‌ها به حوزه‌های پزشکی، تغذیه و مکمل‌های دارویی نیز گسترش پیدا کرد (۴، ۵). در این میان، باکتری‌های اسید لاکتیک، به‌ویژه گونه‌های جنس *لاکتوباسیلوس*، به‌دلیل ویژگی‌های عملکردی خاص مورد توجه فراوانی قرار گرفته‌اند. یکی از سویه‌های شناخته‌شده در این زمینه، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 [2] است که به‌واسطه‌ی ویژگی‌هایی نظیر مقاومت در برابر اسید معده و نمک‌های صفراوی، توانایی چسبندگی به سلول‌های اپیتلیال روده، تولید آنزیم لاکتاز و فعالیت ضدمیکروبی، در صنعت لبنیات بسیار کاربرد دارد (۶، ۷). این سویه در فهرست لیست گرس [3] قرار دارد و به‌طور کلی ایمن شناخته‌شده است و سابقه‌ای طولانی در مصرف انسانی دارد (۸).

با وجود مقاومت بالای بیشتر سویه‌ها، حفظ زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در طول فرآیند تولید، نگهداری و دستگاه گوارش، یکی از چالش‌های اساسی تجاری‌سازی این محصولات است؛ زیرا کاهش زنده‌مانی می‌تواند اثرات تغذیه‌ای و درمانی محصول نهایی را تحت‌تأثیر قرار دهد (۹). بر اساس توصیه‌ی فدراسیون بین‌المللی لبنیات، حداقل تعداد باکتری زنده برای اثرگذاری در محصولات غذایی باید بین $10^{6}$-$10^{8}$CFU/mL باشد (۱۰). با این حال، شرایط نامطلوب نگهداری و عبور از دستگاه گوارش، بقای آن‌ها را تهدید می‌کند. برای غلبه بر این چالش، استفاده از فناوری‌های پایدارسازی ضروری است. خشک‌کردن انجمادی [4] یکی از روش‌های رایج در حفظ سلول‌های پروبیوتیک به‌شمار می‌رود. این فرآیند شامل تصعید آب از حالت یخ‌زده تحت خلأ بوده و موجب حفظ ساختارهای فیزیکی و زیستی سلول‌ها می‌شود (۲). با این وجود، در طول این فرآیند ممکن است آسیب‌هایی نیز به ساختار سلولی وارد گردد؛ از جمله تشکیل بلورهای یخ، فشار اسمزی، تولید رادیکال‌های آزاد و تغییر در سیالیت غشای سلولی؛ که این موارد می‌توانند انتقال مواد مغذی، فعالیت آنزیم‌های متابولیک و پایداری RNA را مختل کنند (۱۱). به‌منظور کاهش این آسیب‌ها، استفاده از ترکیبات محافظ انجمادی [5] ضروری است. این ترکیبات با ممانعت از تشکیل بلورهای یخ، کاهش استرس اکسیداتیو، تثبیت غشا و حفظ ساختار زیستی سلول‌ها، در افزایش پایداری باکتری‌ها، نقش کلیدی دارند. به‌طور کلی، این مواد به دو گروه ترکیبات با وزن مولکولی پایین مانند قندها، الکل‌های قندی و اسیدهای آمینه و ترکیبات با وزن مولکولی بالا مانند پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و پلیمرهای زیستی تقسیم می‌شوند. ترکیبات گروه دوم که بیشتر منبع طبیعی دارند، معمولاً اثر حفاظتی گروه اول را تقویت می‌کنند و انتخاب صحیح آن‌ها، نقش تعیین‌کننده‌ای دارد (۱۲).

گیاه کروشنه (*Vicia ervilia*) که بومی مناطق خشک ایران و خاورمیانه است، در سال‌های اخیر توجه بسیاری از محققان را جلب کرده است. دانه‌ی این گیاه به‌دلیل ترکیبات

[1] WHO/FAO
[2] *Lactobacillus acidophilus* LA5
[3] GRAS
[4] Lyophilization/Freez-drying
[5] Cryoprotectants

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

زیست‌فعال از جمله پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدان‌ها و همچنین قابلیت‌هایی مانند جذب رطوبت، ایجاد ساختار ژلی مناسب، هزینه پایین و امکان تولید محلی (۱۳، ۱۴)، به‌عنوان یک عامل محافظ انجمادی طبیعی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

ازآنجاکه تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه‌ی بررسی اثرایزوله‌ی پروتئین دانه کروشنه بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوساسیدوفیلوس* LA5 انجام نشده است، هدف از تحقیق حاضر، بررسی کارایی ایزوله پروتئین دانه کروشنه در محافظت انجمادی این باکتری در مقایسه با شیرپس‌چرخ (شاهد) در طی خشک‌کردن انجمادی و درطول مدت زمان۴۲ روز نگهداری در دمای°C ۴، بوده است.

## مواد و روش ها

### مواد

*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5، به صورت پودر لیوفیلیزه، از شرکت پیشگامان پخش صدیق، نمایندگی شرکت کریستن هانسن در ایران، تهیه شد. شیر پس چرخ (کاله) از یکی از فروشگاه‌های محلی خریداری شد. دانه کروشنه از یکی از عطاری‌های معتبر شهر زنجان (حاج نوروز عطار) تهیه گردید. محیط‌های کشت و مواد شیمیایی مورد استفاده از نمایندگان شرکت مرک و سیگما خریداری شدند.

### روش‌ها

### استخراج پروتئین از دانه‌ی کروشنه

ابتدا، به منظور انجام فرایند تلخی‌زدایی و حذف ترکیباتی نظیر تانن‌ها از روش خیساندن در آب[1] به عنوان یک روش رایج (۱۵) استفاده شد. پس از h ۷۲ خیساندن در دمای محیط و خشک کردن تا میزان رطوبت ۱۰ درصد، دانه‌ها با استفاده از آسیاب صنعتی مجهز به الک با مش ۷۰ ، کاملا به پودر یکنواخت تبدیل شدند. سپس از حلال هگزان به نسبت ۱ به ۵ (وزنی/حجمی) و به روش غرقابی برای چربی‌زدایی از پودر استفاده شد. پودر چربی‌زدایی‌شده با نسبت ۱ به ۵ (وزنی/حجمی) با آب مقطر مخلوط شد و pH آن با استفاده از سدیم هیدروکسید ۲ نرمال به ۱۱ رسانیده شد. این محلول به مدت ۹۰min روی همزن مغناطیسی هم‌زده شد تا حلالیت پروتئین‌ها افزایش پیدا کند. در ادامه، محلول در لوله‌های سانتریفیوژ ۵۰mL تقسیم و به مدت ۱۵ min با سرعت rpm ۷۵۰۰ در دمای °C ۱۵ سانتریفیوژ شد. مایع رویی، با استفاده از کلریدریک اسید ۰/۱ نرمال تا pH معادل ۲/۵ اسیدی شد و به مدت یک ساعت در دمای محیط روی همزن به طور کامل مخلوط شد. پس از آن، محلول دوباره به مدت min ۱۵ در سرعت rpm ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی جدا شد و با مایع رویی به‌دست‌آمده از مرحله قبل مخلوط شد و pH آن با سدیم هیدروکسید ۱ نرمال به ۴/۵ (نقطه ایزوالکتریک ایزوله پروتئین دانه کروشنه) رسانده شد. مخلوط به مدت ۲۰min در دمای °C ۴ و با نیروی rpm ۵۵۷۰ سانتریفیوژ شد تا رسوب پروتئینی تشکیل شود. برای افزایش خلوص، رسوب پروتئینی طی دو مرحله مجزا با آب مقطر شسته شد و پس از هر مرحله، به مدت min ۵ با نیروی rpm ۵۵۷۰ سانتریفیوژ شد (۱۶).

### فعال‌کردن باکتری لیوفیلیزه

برای فعال‌کردن باکتری، ابتدا سویه‌ی لیوفیلیزه در محیط کشت MRS براث تلقیح شد و به مدت h ۴۸ در دمای °C ۳۷ در جار بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شد. رشد باکتری با مشاهده حرکات دودی در هنگام تکان‌دادن لوله‌های حاوی محیط کشت تأیید شد. سپس برای شمارش کلنی‌ها، رقت‌های متوالی از سوسپانسیون فعال باکتری‌ها، تهیه شد و از آن‌ها روی محیط کشت MRS آگار کشت داده شد. نمونه‌ها در دمای°C ۳۷ به‌مدت h ۷۲ در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شد. سپس کلنی‌های سفید-کرم رنگ، به‌عنوان مشخصه‌ی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، شمارش شدند (۱۷).

### جداسازی توده‌ی سلولی

کشت‌های باکتریایی فعال شده در محیط MRS براث به‌مدت min ۵ با نیروی rpm ۵۵۷۰ سانتریفیوژ شدند. سپس، رسوب حاصل حاوی توده‌ی سلولی باکتری‌ها، از مایع رویی جدا شده و در ادامه مورد استفاده قرار گرفت.

[1] Maceration

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

### استانداردسازی غلظت توده‌ی سلولی و شمارش کلنی‌ها

برای استانداردسازی غلظت توده‌ی سلولی از روش کدورت سنجی با استاندارد نیم‌مک‌فارلند[1] استفاده شد. در این روش، به رسوب سلولی به‌تدریج محلول سرم فیزیولوژی استریل افزوده شد تا میزان جذب نوری این سوسپانسیون در طول موج ۶۲۵ nm توسط اسپکتروفتومتر به حدود ۰/۱۱۸ برسد که غلظت میکروارگانیسم به‌طور تقریبی معادل با $1/5 \times 10^8$ CFU/mL برآورده می‌شود (۱۸). برای اطمینان از صحت قرائت‌های جذب، محلول سرم فیزیولوژی خالص به‌عنوان نمونه‌ی شاهد مورد استفاده قرار گرفت. همچنین، به‌منظور راستی‌آزمایی و اطمینان از انطباق واقعی تعداد میکروارگانیسم‌ها با غلظت برآوردی، کشت روی محیط MRS آگار انجام شد و پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ °C در شرایط بی‌هوازی، با نتایج جذب، تطابق داده شد.

### آماده‌سازی و استفاده از تیمارهای محافظت انجمادی در فرایند خشک کردن

به‌منظور بررسی اثربخشی تیمارهای مختلف محافظت انجمادی بر میزان زنده‌مانی، به مقادیر ۰/۱، ۰/۵ و ۱ گرم از غلظت‌های مختلف پروتئین دانه کروشنه در ۱۰mL سرم فیزیولوژی استریل (کلرید سدیم ۰/۸۵ درصد) حل شد تا سوسپانسیون‌هایی با ۱، ۵ و ۱۰ درصد به‌دست آید. سپس به هر ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی توده‌ی سلولی، ۱۰۰ میکرولیتر از هر تیمار از محلول‌های محافظ انجمادی و در تیمار شاهد، شیر پس‌چرخ اضافه شد. تمامی نمونه‌ها به روش خشک کردن انجمادی، کاملا خشک شدند.

### تعیین بهترین غلظت ایزوله پروتئین دانه کروشنه در میزان زنده‌مانی باکتری‌ها

به‌منظور ارزیابی اثر حفاظتی تیمارهای مورد استفاده، میزان زنده‌مانی باکتری‌ها پس از خشک‌کردن با استفاده از روش کدورت‌سنجی در طول‌موج ۶۲۵ nm و همچنین با شمارش کلنی‌های قابل رشد به روش کشت سطحی روی محیط کشت MRS آگار بررسی شد (۱۸).

### مقایسه ویژگی‌های ساختاری ایزوله پروتئین دانه کروشنه و شیر پس‌چرخ

#### طیف‌سنجی مادون قرمز[2]

برای شناسایی گروه‌های عاملی و پیوندهای شیمیایی موجود در نمونه پروتئینی، از طیف‌سنج FT-IR دربازه‌ی طیفی ۴۰۰۰ تا $500\ cm^{-1}$ استفاده شد (۱۷).

#### پراش اشعه ایکس[3]

جهت بررسی ویژگی‌های ساختاری و بلورینگی نمونه ازدستگاه پراش اشعه ایکس مجهز به تابش Cu Kα ($\lambda$ = 0.15406 nm) درمحدوده‌ی زاویه‌ای $2\theta$ از ۵ تا ۸۰ درجه، با ولتاژ ۴۰ Kv وجریان ۳۰ mA ، در نرخ اسکن ۲ درجه دردقیقه استفاده شد (۱۸).

#### میکروسکوپ الکترونی روبشی[4]

برای بررسی مورفولوژی پوشش‌ها ازمیکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. نمونه پودر باکتری‌های محافظت شده، باپوششی ازطلا (۶–۱۱ nm، ۴۰s) پوشانده شد. سپس تصاویر، تحت ولتاژ ۱۵ Kv توسط شتاب‌دهنده الکترون و با فاصله طولی ۷/۵ mm تا ۹/۵ ثبت شدند.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل نتایج داده‌های حاصل از سه تکرار در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA)و با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه‌ی ۱۶) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفت و به صورت میانگین ± انحراف معیار،گزارش شد. برای تعیین اختلاف آماری میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p < 0.05$) استفاده شد.

## نتایج

### بررسی اثربخشی ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه و شیر پس‌چرخ در حفظ زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 در طول مدت زمان نگهداری

بررسی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 در حضور غلظت‌های مختلف ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه

[1] 0.5 McFarland standard
[2] Fourier-Transform Infrared
[3] X-ray diffraction
[4] Scanning Electron Microscopy (SEM)

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

(۱، ۵ و ۱۰ درصد) و شیر پس‌چرخ (شاهد) در جدول ۱ آورده شده است.

**جدول ۱- بررسی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 در حضور غلظت‌های مختلف ایزوله‌ی پروتئین دانه کروشنه (۱، ۵ و ۱۰درصد) و شیر پس‌چرخ**

| نمونه | تعداد سلول‌های زنده در مدت زمان نگهداری(CFU/mL) | | |
|---|---|---|---|
| **ایزوله پروتئین دانه کروشنه (درصد)** | **۱** | **۲۱** | **۴۲** |
| **۱** | $۱\times۱۰^{۸}\pm۰/۴^{Aa}$ | $۸\times۱۰^{۷}\pm۰/۸^{Bb}$ | $۱\times۱۰^{۷}\pm۰/۹^{Bc}$ |
| **۵** | $۱\times۱۰^{۸}\pm۰/۵^{Aa}$ | $۹\times۱۰^{۷}\pm۰/۷^{Ab}$ | $۴\times۱۰^{۷}\pm۰/۸^{Ac}$ |
| **۱۰** | $۱\times۱۰^{۸}\pm۰/۸^{Aa}$ | $۹\times۱۰^{۷}\pm۰/۶^{Aa}$ | $۴\times۱۰^{۷}\pm۰/۹^{Ab}$ |
| **۰ (شاهد/ شیر پس چرخ)** | $۱\times۱۰^{۸}\pm۰/۸^{Aa}$ | $۴\times۱۰^{۷}\pm۰/۹^{Cb}$ | $۹\times۱۰^{۴}\pm۰/۸^{Cc}$ |

حروف متفاوت بزرگ و کوچک انگلیسی به ترتیب در هر ستون (بین نمونه‌ای مختلف در یک زمان) و سطر (طول مدت زمان نگهداری) بیانگر اختلاف آماری معنادار در سطح اطمینان ۵ درصد هستند ($p<0.05$)

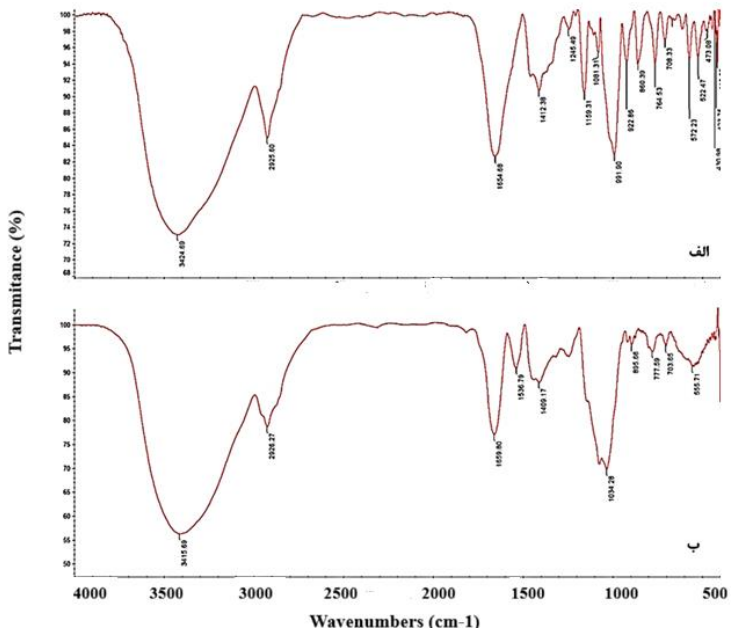
مطابق نتایج جدول ۱، هر دو ماده محافظ انجمادی در حفظ زنده‌مانی باکتری‌ها موثر بودند؛ اما در فواصل زمانی مختلف کارایی متفاوتی نشان دادند. بررسی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 در حضور غلظت‌های مختلف ایزوله پروتئین دانه‌ی کروشنه (۱، ۵ و ۱۰درصد)، نشان دادکه با افزایش غلظت ایزوله‌ی پروتئین در کل مدت زمان نگهداری، میزان بقای سلول‌ها به‌طور معناداری افزایش پیدا می‌کند ($p<0.05$).

## بررسی ساختار نمونه‌های حاوی ۱۰ درصد ایزوله پروتئین دانه کروشنه و شیر پس چرخ

### طیف‌سنجی مادون قرمز

بر اساس نتایج حاصل از طیف‌سنجی مادون قرمز (شکل ۱ - الف) حضور باندهای مشخص آمیدی ۱ در $۱۶۵۴/۶۸\ cm^{-1}$، آمید ۲ در $۱۵۴۱/۳۹\ cm^{-1}$وآمید ۳ در ۱۲۴۵/۴۹ و $۱۱۶۹/۳۱cm^{-1}$به‌وضوح نشان‌دهنده‌ی ساختار پپتیدی سالم و غنی از گروه‌های عاملی فعال در نمونه‌ی حاوی۱۰ درصد ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه، است (۱۶). طیف FTIR شیر پس‌چرخ (شکل ۱-ب) نیز نشان‌دهنده‌ی ساختار پروتئینی مشخص و پایداری بالا از نظر گروه‌های عاملی است.

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]




**شکل ۱- طیف‌سنجی مادون قرمز نمونه‌های تهیه شده با ۱۰ درصدایزوله پروتئین دانه‌ی کروشنه (الف) و شیرپس‌چرخ (ب)**

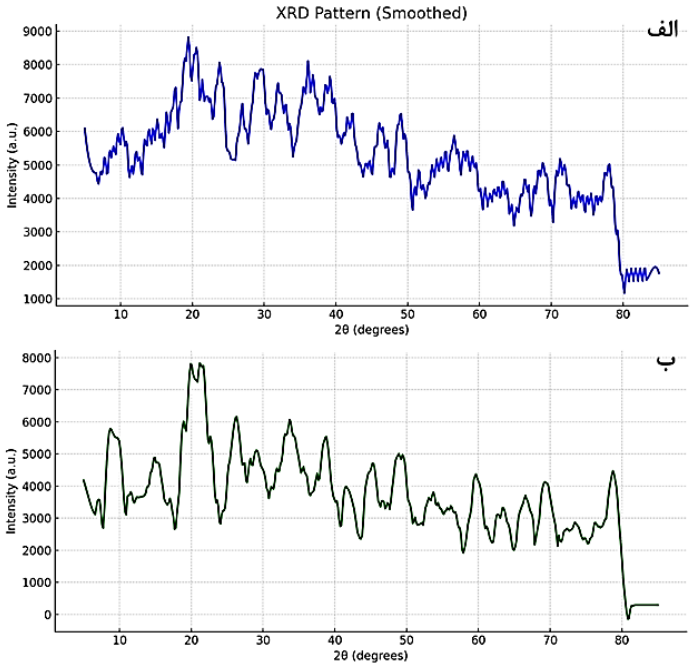
## الگوی پراش اشعه ایکس

الگوی XRD نمونه‌ی حاوی ۱۰ درصد ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه (شکل ۲-الف)، نشان‌دهنده پراش نسبتاً ضعیف و پیک‌های عریض در محدوده‌ی 2θ بین °۱۵ تا °۳۵ می‌باشد. در حدود زاویه °۲۰ تا °۲۲، یک پیک مشخص مشاهده می‌شودکه معمولاً به الگوی صفحات بتای[1] پروتئین‌های گیاهی نسبت داده می‌شود (۱۹). کاهش شدت پراش در زوایای بالای °۴۰ نیزگواه بر نظم محدود و وجود نواحی نامنظم در ساختار مولکولی پروتئین است. عدم حضور پیک‌های تیز و باریک در الگو و وجودپیک‌های پهن[2] حاکی از ساختار آمورف یا نیمه‌بلورین پروتئین استخراج شده است. الگوی پراش اشعه ایکس نمونه‌ی شیر پس‌چرخ (شکل ۲-ب)، در بازه‌ی زاویه‌ای ° ۵ تا °۸۰ نشان‌دهنده ساختاری با پراش مشخص و چندین پیک برجسته در زوایای مختلف است. پیک اصلی در حدود -۲۱ °۱۹ با شدت بالا مشاهده می‌شود که معمولاً به فازهای بلورین مرتبط با پروتئین‌های شیر ازجمله α-لاکتآلبومین و β-لاکتوگلوبولین نسبت داده می‌شود. همچنین، پیک‌های فرعی با شدت متوسط در نواحیθ ۲ حدود°۳۰، ° ۴۵ و° ۵۵ دیده می‌شوند؛که بیانگر وجود فازهای بلوری جزئی یا باقی‌مانده‌های معدنی احتمالی است (۲۰).

[1] β-sheet

[2] Broad Peaks

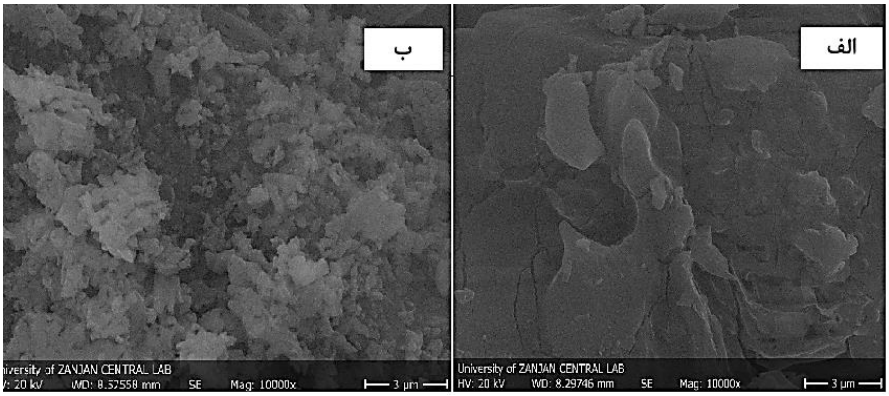
[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]




**شکل ۲– الگوی پراش اشعه ایکس نمونه‌های تهیه شده با ۱۰ درصدایزوله پروتئین دانه‌ی کروشنه (الف) و شیر پس‌چرخ (ب)**

## میکروسکوپ الکترونی روبشی

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی ابزاری کارآمد برای ارزیابی ریزساختار و مورفولوژی سطحی ترکیبات محافظ انجمادی و سلول‌های پروبیوتیکی پس از فرآیندخشک‌کردن انجمادی به شمارمی‌آیند. در این مطالعه، ساختار سطحی نمونه‌ی حاوی۱۰ درصد ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه، به‌صورت متراکم، یکنواخت و بدون حالت تکه‌تکه بودند (شکل ۳–الف). درمقابل، تصویرمیکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه‌های تیمار شده با شیر پس‌چرخ (شکل ۳–ب)، نشان‌دهنده ساختاری نسبتاً ناهمگون، همراه با سطوح شکننده و تکه‌تکه شده بود؛ این وضعیت ناشی از عدم ایجاد ماتریس فشرده محافظ در اطراف سلول‌های پروبیوتیکی است (۲).




**شکل۳– تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه‌های تهیه شده با ۱۰ درصدایزوله پروتئین دانه‌ی کروشنه (الف) و شیر پس‌چرخ (ب)**

## بحث

### زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 در طول مدت زمان نگهداری

افزایش زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 با افزایش غلظت ایزوله پروتئین دانه‌ی کروشنه احتمالاً ناشی از تقویت ساختار ماتریسی ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه پیرامون سلول‌های باکتریایی است که نقش عایق حرارتی و

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

مکانیکی ایفا کرده و مانع تماس مستقیم یخ‌های تشکیل‌شده با ساختار سلولی می‌شود. همچنین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی این پروتئین مانند ظرفیت جذب آب و روغن، خواص آنتی‌اکسیدانی و قابلیت تشکیل ژل ویسکوز، احتمالاً در ایجاد محیطی پایدارتر برای سلول‌ها در طول فرآیند خشک‌کردن انجمادی نقش داشته‌اند. این یافته‌ها با گزارش‌های پیشین در خصوص عملکرد حفاظتی سایر پروتئین‌های گیاهی مانند ایزوله نخود و برنج هم‌راستا هستند (۴، ۵). در بررسی مقایسه‌ای میان دو تیمار ایزوله پروتئین دانه کروشنه ۱۰ درصد و شاهد، مشخص شد که درروز اول، زنده‌مانی باکتری‌ها در هر دو مورد مشابه بود (CFU/mL ۱×۱۰$^{۸}$). با این‌حال در طول مدت زمان نگهداری، کاهش معناداری ($p<0.05$) در تعداد باکتری‌ها به ویژه در مورد شیر پس چرخ، مشاهده شد.کارایی اولیه شیر پس‌چرخ در حفاظت از سلول‌های پروبیوتیکی را می‌توان به حضور اجزای پروتئینی و قندی در ساختار آن نسبت داد (۲). در زمان ۳ هفته بعد از خشک‌کردن انجمادی، زنده‌مانی باکتری‌ها در شیر پس‌چرخ به CFU/mL ۱۰$^{۷}$ ×۴ کاهش یافت در حالی‌که در ایزوله پروتئین دانه کروشنه ۱۰ درصد، به‌طور موثری از باکتری‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد محافظت شده بود و تعداد باکتری‌ها نسبت به روز اول تغییر معناداری ($p>0.05$) نداشت (CFU/mL ۱۰$^{۷}$×۹). در نهایت ۴۲ روز بعد از خشک‌کردن انجمادی، زنده‌مانی در گروه شیرپس‌چرخ به CFU/mL ۱۰$^{۴}$×۹ کاهش یافت در حالی‌که در گروه حاوی ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه ۱۰ درصد، زنده‌مانی به CFU/mL ۱۰$^{۷}$×۱ رسید که باز هم نشان‌دهنده عملکرد بهتر این پروتئین نسبت به شیر پس‌چرخ در حفظ زنده‌مانی باکتری‌ها بود. این ویژگی مشابه با اثراتی هستند که در برخی از پروتئین‌های طبیعی در مطالعات گذشته گزارش شده‌اند. در سال ۲۰۲۳، کاویاد و کاونوپارات[1] (۲۱)، محافظت انجمادی از *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*[2] در طی انجماد و در طول مدت زمان نگهداری توسط پودر سویا را در مقایسه با شیرخشک بدون چربی، در طی ۵ ماه نگهداری در دو دمای ۴ °C و ۲۵ مورد بررسی قرار دادند کردند. نتایج نشان داد که پودر سویا و شیر خشک اثرات مشابهی در زمان خشک کردن و ۴ ماه اولیه نگهداری به ویژه در دمای ۴ °C داشتند و اما در ماه ۵ نگهداری، پودر سویا به طور معنی داری اثر محافظتی بیشتری نشان داد. اثر محافظتی هر دو ماده به حضور ترکیبات درشت ملکول پروتئینی و کربوهیدرات‌های نامحلول نسبت داده می‌شود که اطراف غشای سلولی لایه ویسکوز تشکیل می‌دهند و از سلول‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی محافظت می‌کند. حضور اسیدهای آمینه و مواد معدنی به ویژه کلسیم نیز موثر شناخته شده است. همچنین در سال ۲۰۱۷، هوانگ[3] و همکاران (۲۲)، گزارش کردند که پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهای گیاهی مانند نشاسته‌ها، اینولین و سویا در برخی موارد، پایداری پروبیوتیک‌ها را به‌ویژه در دوره‌های نگهداری طولانی‌تر، بهتر از شیر پس‌چرخ حفظ کرده‌اند.

**FTIR**

مطابق شکل ۱، در نمونه حاوی ۱۰ درصد پروتئین دانه‌ی کروشنه حضور باندهای آمیدی ۱ و ۲، مؤید حفظ ساختار ثانویه پروتئین بوده و قابلیت آن را در تثبیت ساختارهای زیستی در شرایط استرس سرمایی افزایش می‌دهد. همچنین، باند پهن مشاهده شده در ۳۴۲۴/۶۹ $cm^{-1}$ که مربوط به پیوندهای هیدروژنی گروه‌های –OH و –$NH_2$ می‌باشد، نشان‌دهنده توانایی بالای این ترکیب در برقراری پیوندهای غیرکووالانسی با دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها است. وجود این گروه‌های عاملی فعال، امکان پایدارسازی ساختار غشای سلولی، کاهش تنش‌های حاصل از تشکیل بلورهای یخ و حفظ ساختار پروتئین‌ها را فراهم می‌سازد. بنابراین، ساختار شیمیایی ایزوله پروتئین دانه کروشنه از نظر دارا بودن باندهای عملکردی مؤثر، نشان‌دهنده‌ی پتانسیل بالا برای ایفای نقش به‌عنوان یک محافظ انجمادی طبیعی و مؤثر در فرآیند خشک کردن انجمادی پروبیوتیک‌ها است (۲، ۲۳). اما در نمونه شاهد وجود باند پهن در ناحیه ۳۴۱۵/۶۹$cm^{-1}$ بیانگر حضور گروه‌های هیدروکسیل و آمینی با توانایی ایجاد

[1] Kaewiad and Kaewnopparat
[2] *Lactobacillus fermentum* SK54
[3] Huang

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

پیوند هیدروژنی با اجزای غشای سلولی می‌باشد. همچنین باندهای مشاهده شده در نواحی ۱۴۰۳/۱۷ $cm^{-1}$ و ۱۰۳۴/۲۸مربوط به ارتعاشات C–O و باقی‌مانده‌های قندی، نقش بسزایی در حفظ رطوبت، مهار تشکیل بلورهای یخ و تعامل با سطح سلولی ایفا می‌کنند. این نتایج نشان می‌دهند که شیر پس‌چرخ از نظر ترکیب شیمیایی، ساختار مولکولی و گروه‌های عاملی فعال، گزینه‌ای مؤثر برای استفاده به‌عنوان محافظ انجمادی در فرمولاسیون پروبیوتیک‌ها به‌شمار می‌رود (۲، ۲۳).

**XRD**

ساختار XRD (شکل ۲) برای عملکرد محافظت انجمادی پروتئین دانه‌ی کروشنه، به‌ویژه در خشک‌کردن انجمادی، مطلوب ارزیابی می‌شود؛ زیرا ساختارهای آمورف تمایل کمتری به ترک‌خوردگی و شکنندگی دارند و از سلول‌های پروبیوتیک در برابر فشارهای اسمزی و تغییرات حرارتی بهتر محافظت می‌کنند (۷، ۲۴). الگوی پراش شیر پس چرخ نیز بیانگر ساختار نیمه‌بلورین آن می‌باشد؛ به‌طوریکه بخش‌هایی ازساختار دارای نظم مولکولی مشخص هستند و درکنار نواحی آمورف یا بی‌نظم، تشکیل یک ماتریس متعادل می‌دهند. چنین ساختاری موجب می‌شود که ترکیب مورد نظر از یک سودارای پایداری فیزیکی بالا و ازسوی دیگر، انعطاف‌پذیری عملکردی مناسب برای استفاده به عنوان یک ماده‌ی محافظ انجمادی در فرآیند خشک‌کردن باشد (۲۰).

بر اساس نتایج به دست آمده، هر دو پروتئین، دارای ساختارهای پپتیدی پایدار و گروه‌های عاملی کلیدی هستند و از نظر ساختار فیزیکی و شیمیایی قابلیت استفاده به‌عنوان محافظ انجمادی در فرمولاسیون پروبیوتیک‌ها را دارند. با این حال، پروتئین شیر پس‌چرخ به‌دلیل داشتن سابقه‌ی مصرف صنعتی، ساختار منظم‌تر و برهم‌کنش‌های بهتر با غشای باکتری، عملکرد شناخته‌شده‌تری دارد. در مقابل، ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه نیز ساختاری بسیار مناسب با گروه‌های فعال و رفتار آمورف‌گونه دارد که آن را به یک گزینه طبیعی، کم‌هزینه و زیست‌سازگار جایگزین تبدیل می‌کند.

**SEM**

ساختار منسجم نشان داده شده توسط SEM (شکل ۳) در ایزوله پروتئین دانه کروشنه احتمالاً ناشی ازماهیت آمفی‌فیلیک این پروتئین و توانایی آن در ایجاد شبکه‌های پلیمری پایدار طی فرآیند انجماد و خشک‌کردن است. این نتایج گزارش‌های پیشین درباره ساختار مقاوم پوشش‌های حاصل از پروتئین‌های برنج و نخود مشابهت دارد (۴، ۶). در مقابل هرچند ترکیبات موجود در شیر پس‌چرخ مانند لاکتوز وکازئین‌ها می‌توانند نقش نسبی در کاهش آسیب داشته باشند؛ اما توانایی آن‌ها در ایجاد سد مکانیکی و ساختار منسجم، به‌ویژه در بازه‌های زمانی نگهداری طولانی، محدودتر از پروتئین دانه کروشنه می‌باشد.

## نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که پروتئین دانه‌ی کروشنه، در غلظت ۱۰ درصد به‌عنوان یک ترکیب گیاهی مؤثر، قادر است در فواصل زمانی طولانی‌تر، پایداری و زنده‌مانی بالاتری از باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 در دوره‌ی ۴۲ روز نگهداری در دمای ۴ °C فراهم آورد. تحلیل‌های طیف‌سنجی FTIR و الگوی XRD حاکی از حضور ساختارهای آمورف، گروه‌های عاملی فعال و ظرفیت بالای برهم‌کنش‌های غیرکووالانسی در ساختار ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه بود. این ویژگی‌ها در کنار ساختار متراکم و بدون ترک مشاهده شده در تصاویر SEM، بیانگر توانایی بالای این پروتئین در حفاظت از ساختار سلولی پروبیوتیک‌ها طی فرآیند خشک‌کردن انجمادی است. در مجموع، ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه به‌دلیل ویژگی‌های ساختاری، عملکردی و گیاهی بودن، می‌تواند به‌عنوان جایگزینی طبیعی، اقتصادی و زیست‌سازگار برای پروتئین‌های متداول لبنی در فرمولاسیون‌های پروبیوتیکی مورد استفاده قرار گیرد.

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

## منابع


1. FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario: FAO/WHO Working Group. 2002.
2. Wang H, Huang T, Liu K, Yu J, Yao G, Zhang W, Sun T. Protective effects of whey protein hydrolysate on *Bifidobacterium animalis* ssp. lactis Probio-M8 during freeze-drying and storage. Journal of Dairy Science. 2022;105(9):7308–7321.
3. Afzal A, Afzaal M, Saeed F, Shah YA, Raza MA, Khan MH, Teferi Asres D. Milk protein-based encapsulation of probiotics and other food material: comprehensive review. International Journal of Food Properties. 2024;27(1):245–262.
4. Mudgil P, Alkaabi F, Khan H, Javed M, Hajamohideen AR, Hamed F, Maqsood S. Enhanced viability and stability of the *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 probiotic strain following microencapsulation in pea and rice protein-inulin conjugates. Frontiers in Sustainable Food Systems. 2024;8:1284069.
5. Savedboworn W, Noisumdang C, Arunyakanon C, Kongcharoen P, Phungamngoen C, Rittisak S, Phattayakorn K. Potential of protein-prebiotic as protective matrices on the storage stability of vacuum-dried probiotic *Lactobacillus casei*. LWT. 2020;131:109578.
6. Kent RM, Doherty SB. Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. Food Research International. 2014;64:567–576.
7. Rashwan AK, Osman AI, Abdelshafy AM, Mo J, Chen W. Plant-based proteins: advanced extraction technologies, interactions, physicochemical and functional properties, food and related applications, and health benefits. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2025;65(4):667–694.
8. Reddy KBPK, Awasthi SP, Madhu AN, Prapulla SG. Role of cryoprotectants on the viability and functional properties of probiotic lactic acid bacteria during freeze drying. Food Biotechnology. 2009. 23(3): 243–265.
9. Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. Journal of Functional Foods. 2014;9:225–241.
10. International Dairy Federation (IDF). Probiotics in dairy products. Bulletin of the International Dairy Federation 455/2012. Brussels: International Dairy Federation. 2012.
11. Kang P, Kim SJ, Park HJ, Han SJ, Kim IC, Lee H, Yim JH. Trends and challenges in plant cryopreservation research: A meta-analysis of cryoprotective agent development and research focus. Plants. 2025;14(3):447.
12. Riaz QUA, Masud T. Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2013;53(3):231–244.
13. Song N, Jiang X, Gu J, Zhang B, Zhao H. Plant-based oat peptides as cryoprotectants mitigate freezing damage to *Lactobacillus bulgaricus* CICC 22163. Food Research International. 2025. 203: 115855.
14. Vioque J, Girón-Calle J, Torres-Salas V, Elamine Y, Alaiz M. Characterization of *Vicia ervilia* (bitter vetch) seed proteins, free amino acids, and polyphenols. Journal of Food Biochemistry. 2020;44(7):e13271.
15. Hoque MB, Ayman U, Sheikh MS, Hannan MA, Haque P, Baria B, Rahman MM, Jalil MA, Das D. An in-depth review on tannin sources, extraction methods, and industrial applications. Discover Food. 2025;5(1): p.401.
16. Sorourian R, Khajehrahimi AE, Tadayoni M, Azizi MH, Hojjati M. Structural characterization and cytotoxic, ACE-inhibitory and antioxidant activities of polysaccharide from Bitter vetch (*Vicia ervilia*) seeds. Journal of Food Measurement and Characterization. 2022;16(5):4075–4091.
17. Marchesi A, Nader Macías MEF. Probiotic lactic acid bacteria for vaginal application: Optimization of biomass production and freeze-drying conditions. Applied Microbiology. 2023;3(2):519–535.
18. Mahesh PP, Kolape J, Sultana H, Neelakanta G. "McFarland standards-based spectrophotometry method for


[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

calculating approximate multiplicity of infection for an obligate intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum*." *Microorganisms* 2025;13: 662.

19. Nnamezie AA, Famuwagun AA, Gbadamosi SO. Characterization of okra seed flours, protein concentrate, protein isolate and enzymatic hydrolysates. Food Production Processing and Nutrition. 2021;3(1):14.

20. Banavara DS, Anupama D, Rankin SA. Studies on physicochemical and functional properties of commercial sweet whey powders. Journal of Dairy Science. 2003;86(12):3866–3875.

21. Kaewiad K, Kaewnopparat S. Protective effect of soybean powder as a cryoprotectant and encapsulating material on the survival of *Lactobacillus fermentum* SK54 during freeze drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions. Journal of Food Science and Agricultural Technology. 2023;7(1):20–25.

22. Huang S, Vignolles ML, Chen XD, Le Loir Y, Jan G, Schuck P, et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. Trends in Food Science & Technology. 2017; 63:1–17.

23. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. Biochimica et Biophysica Acta. 2007;1767(9): 1073–1101.

24. Saarela M, Virkajärvi I, Alakomi HL, Sigvart-Mattila P, Matto J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage. International Dairy Journal. 2009;19(12):732–738.

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]