



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

Vida Gholifar<sup>1</sup>, Reza Rezaei Mokarram<sup>1</sup>, Mahmood Sowti Khiabani<sup>1</sup>, **Soheila Zarringhalami**<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>2</sup> 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

\* zarringhalami@znu.ac.ir

## 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 ( $1654\text{ cm}^{-1}$ ), amide II ( $1541\text{ cm}^{-1}$ ), and amide III ( $1245$  and  $1169\text{ cm}^{-1}$ ) bands, indicating a well-maintained peptide structure. A broad peak at  $3424\text{ cm}^{-1}$  suggested active  $-\text{OH}$  and  $-\text{NH}_2$  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  $2\theta$  range of  $15\text{--}35^\circ$ , characteristic of amorphous or semi-crystalline matrices, whereas SM showed multiple sharp peaks, including at  $2\theta \approx 20^\circ$ , 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.



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

ویدا قلی‌فر<sup>۱</sup>، رضا رضایی مکرم<sup>۱</sup>، محمود صوتی خیابانی<sup>۱</sup>، سهیلا زرین قلمی<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

<sup>۲</sup> 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 خشک کردن و نگهداری آن‌ها، همواره یکی از چالش‌های اساسی تجاری‌سازی است. بنابراین، در پژوهش حاضر، بررسی امکان استفاده از ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه (*Vicia ervilia*) به عنوان عامل محافظت انجمادی در مقادیر ۱، ۵ و ۱۰ درصد در مقایسه با شیر پس چرخ (شاهد)، در زنده‌مانی لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس LA5 طی فرآیند خشک کردن انجمادی و نگهداری به مدت ۴۲ روز در دمای 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 پس چرخ جهت حفظ باکتری‌ها دارد و حتی در پایان دوره نگهداری، به طور معناداری ( $4 \times 10^7$  CFU/mL) نسبت به شیر پس چرخ ( $9 \times 10^4$  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 به عنوان یک عامل محافظ انجمادی مؤثر، طبیعی و زیست‌سازگار، جایگزین ترکیبات رایج مورد استفاده در نگهداری پروبیوتیک‌ها، مورد استفاده قرار گیرد.

**کلید واژه‌ها:** ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه، خشک کردن انجمادی، شیر پس چرخ، لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس LA5، محافظت انجمادی

\* zaringhalami@znu.ac.ir

گوارش، یکی از چالش‌های اساسی تجاری‌سازی این محصولات است؛ زیرا کاهش زنده‌مانی می‌تواند اثرات تغذیه‌ای و درمانی محصول نهایی را تحت تأثیر 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. خشک کردن انجمادی<sup>۴</sup> 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<sup>۵</sup> 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، الکترولیت‌های 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

## 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 متحد و سازمان بهداشت جهانی<sup>۱</sup>، "پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به میزان کافی، برای میزبان اثرات سودمند دارند"<sup>(۱)</sup>. 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 *Lactobacillus*، به‌دلیل ویژگی‌های عملکردی خاص مورد توجه فراوانی قرار گرفته‌اند. یکی از سویه‌های شناخته‌شده در این زمینه، *Lactobacillus acidophilus* LA5<sup>۲</sup> است که به‌واسطه‌ی ویژگی‌هایی نظیر مقاومت در برابر اسید معده و نمک‌های صفراوی، توانایی چسبندگی به سلول‌های اپیتلیال روده، تولید آنزیم لاکتاز و فعالیت ضد میکروبی، در صنعت لبنیات بسیار کاربرد دارد (۶، ۷). این سویه در فهرست لیست گرس<sup>۳</sup> 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

<sup>۴</sup> Lyophilization/Freeze-drying

<sup>۵</sup> Cryoprotectants

<sup>۱</sup> WHO/FAO

<sup>۲</sup> *Lactobacillus acidophilus* LA5

<sup>۳</sup> GRAS

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.

از آنجاکه تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه‌ی بررسی اثرایزوله‌ی پروتئین دانه کروشنه بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس 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 زمان ۴۲ روز نگهداری در دمای ۴ °C، بوده است.

## مواد و روش‌ها

### مواد

لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس LA5، به صورت پودر لیوفلیزه، 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<sup>۱</sup> به عنوان یک روش رایج (۱۵) استفاده شد. پس از ۷۲ h خیساندن در دمای محیط و خشک کردن تا میزان رطوبت ۱۰ درصد، دانه‌ها با استفاده از آسیاب صنعتی مجهز به الک با مش ۷۰، کاملاً 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 ۹۰ min روی همزن مغناطیسی هم‌زده شد تا حلالیت پروتئین‌ها افزایش پیدا کند. در ادامه، محلول در لوله‌های سانتریفیوژ ۵۰ mL تقسیم و به مدت ۱۵ min با سرعت ۷۵۰۰ rpm در دمای ۱۵ °C 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 ۱۵ min با سرعت ۷۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. مایع رویی جدا شد و با مایع رویی به‌دست آمده 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 ۲۰ min در دمای ۴ °C و با نیروی ۵۵۷۰ rpm سانتریفیوژ شد تا رسوب پروتئینی تشکیل شود. برای افزایش خلوص، رسوب پروتئینی طی دو مرحله معجزاً با آب مقطر شسته شد و پس از هر مرحله، به مدت ۵ min با نیروی ۵۵۷۰ rpm سانتریفیوژ شد (۱۶).

#### فعال کردن باکتری لیوفلیزه

برای فعال کردن باکتری، ابتدا سویه‌ی لیوفلیزه در محیط کشت MRS براث تلقیح شد و به مدت ۴۸ h در دمای ۳۷ °C در جار بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شد. رشد باکتری با مشاهده حرکات دودی در هنگام تکان دادن 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 ۳۷ °C به مدت ۷۲ h در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شد. سپس کلنی‌های سفید-کرم رنگ، به عنوان مشخصه‌ی باکتری‌های لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس، شمارش شدند (۱۷).

#### جداسازی توده‌ی سلولی

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

<sup>1</sup> Maceration

مقایسه ویژگی‌های ساختاری ایزوله پروتئین دانه

کروشنه و شیر پس چرخ

طیف‌سنجی مادون قرمز<sup>۲</sup>

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

پراش اشعه ایکس<sup>۳</sup>

جهت بررسی ویژگی‌های ساختاری و بلورینگی نمونه از دستگاه پراش اشعه ایکس مجهز به تابش  $\text{Cu K}\alpha$  ( $\lambda = 0.15406\text{ nm}$ ) در محدوده‌ی زاویه‌ای  $2\theta$  از ۵ تا ۸۰ درجه، با ولتاژ ۴۰ Kv و جریان ۳۰ mA، در نرخ اسکن ۲ درجه در دقیقه استفاده شد (۱۸).

میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۴</sup>

برای بررسی مورفولوژی پوشش‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. نمونه پودر با کتری‌های محافظت شده، با پوششی از طلا ( $6-11\text{ nm}$ ،  $40\text{ s}$ ) پوشانده شد. سپس تصاویر، تحت ولتاژ ۱۵ Kv توسط شتاب‌دهنده الکترون و با فاصله طولی  $7/5\text{ mm}$  تا  $9/5\text{ mm}$  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 قرار گرفت و به صورت میانگین  $\pm$  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 ایزوله پروتئین دانه‌ی کروشنه و

شیر پس چرخ در حفظ زنده‌مانی لاکتوباسیلوس

/اسیدوفیلوس LA5 در طول مدت زمان نگهداری

بررسی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس LA5 در حضور غلظت‌های مختلف ایزوله پروتئین دانه‌ی کروشنه

استانداردسازی غلظت توده‌ی سلولی و شمارش

کلنی‌ها

برای استانداردسازی غلظت توده‌ی سلولی از روش کدورت سنجی با استاندارد نیم‌مک‌فارلند<sup>۱</sup> استفاده شد. در این روش، به رسوب سلولی به تدریج محلول سرم فیزیولوژی استریل افزوده شد تا میزان جذب نوری این سوسپانسیون در طول موج  $625\text{ nm}$  توسط اسپکتروفتومتر به حدود  $0.118$  برسد که غلظت میکروارگانیزم به‌طور تقریبی معادل با CFU/mL  $1.0 \times 10^8$  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 میکروارگانیزم‌ها با غلظت برآوردی، کشت روی محیط MRS آگار انجام شد و پس از گرمخانه‌گذاری در دمای  $37^\circ\text{C}$  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  $0/1$ ،  $0/5$  و  $1$  گرم از غلظت‌های مختلف پروتئین دانه کروشنه در  $10\text{ mL}$  سرم فیزیولوژی استریل (کلرید سدیم  $0/85$  درصد) حل شد تا سوسپانسیون‌هایی با  $1$ ،  $5$  و  $10$  درصد به‌دست آید. سپس به هر  $100$  میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی توده‌ی سلولی،  $100$  میکرولیتر از هر تیمار از محلول‌های محافظ انجمادی و در تیمار شاهد، شیر پس چرخ اضافه شد. تمامی نمونه‌ها به روش خشک کردن انجمادی، کاملاً 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 خشک کردن با استفاده از روش کدورت‌سنجی در طول موج  $625\text{ nm}$  و همچنین با شمارش کلنی‌های قابل رشد به روش کشت سطحی روی محیط کشت MRS آگار بررسی شد (۱۸).

<sup>۳</sup>X-ray diffraction

<sup>۴</sup>Scanning Electron Microscopy (SEM)

<sup>۱</sup>0.5 McFarland standard

<sup>۲</sup>Fourier-Transform Infrared

(۱، ۵ و ۱۰ درصد) و شیر پس چرخ (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 ۱۰ درصد) و شیر پس چرخ

| نمونه                                | تعداد سلول‌های زنده در مدت زمان نگهداری (CFU/mL) |                                |                                |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| ایزوله پروتئین دانه کروشنه<br>(درصد) | ۱                                                | ۲۱                             | ۴۲                             |
| ۱                                    | $1 \times 10^{4.8 \pm 0.4}$ Aa                   | $8 \times 10^{7.5 \pm 0.8}$ Bb | $1 \times 10^{7.5 \pm 0.9}$ Bc |
| ۵                                    | $1 \times 10^{4.8 \pm 0.5}$ Aa                   | $9 \times 10^{7.5 \pm 0.7}$ Ab | $4 \times 10^{7.5 \pm 0.8}$ Ac |
| ۱۰                                   | $1 \times 10^{4.8 \pm 0.8}$ Aa                   | $9 \times 10^{7.5 \pm 0.6}$ Aa | $4 \times 10^{7.5 \pm 0.9}$ Ab |
| ۰ (شاهد/ شیر پس چرخ)                 | $1 \times 10^{4.8 \pm 0.8}$ Aa                   | $4 \times 10^{7.5 \pm 0.9}$ Cb | $9 \times 10^{7.4 \pm 0.8}$ Cc |

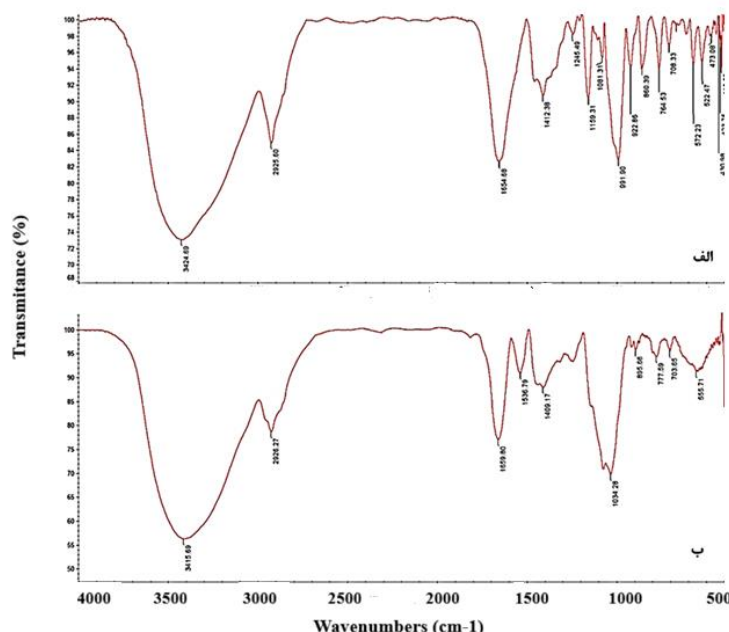
حروف متفاوت بزرگ و کوچک انگلیسی به ترتیب در هر ستون (بین نمونه‌ای مختلف در یک زمان) و سطر (طول مدت زمان نگهداری) بیانگر اختلاف آماری معنادار در سطح اطمینان ۵ درصد هستند ( $p < 0.05$ )

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 ۱۰ درصد)، نشان داد که 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  $1654/68 \text{ cm}^{-1}$ ، آمید ۲ در  $1541/39 \text{ cm}^{-1}$  و آمید ۳ در  $1245/49 \text{ cm}^{-1}$  به‌وضوح نشان‌دهنده‌ی ساختار پپتیدی سالم و غنی از گروه‌های عاملی فعال در نمونه‌ی حاوی ۱۰ درصد ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه، است (۱۶). طیف FTIR شیر پس چرخ (شکل ۱-ب) نیز نشان‌دهنده‌ی ساختار پروتئینی مشخص و پایداری بالا از نظر گروه‌های عاملی است.



شکل ۱- طیف سنجی مادون قرمز نمونه‌های تهیه شده با ۱۰ درصد ایزوله پروتئین دانه‌ی کروشنه (الف) و شیرپس چرخ (ب)

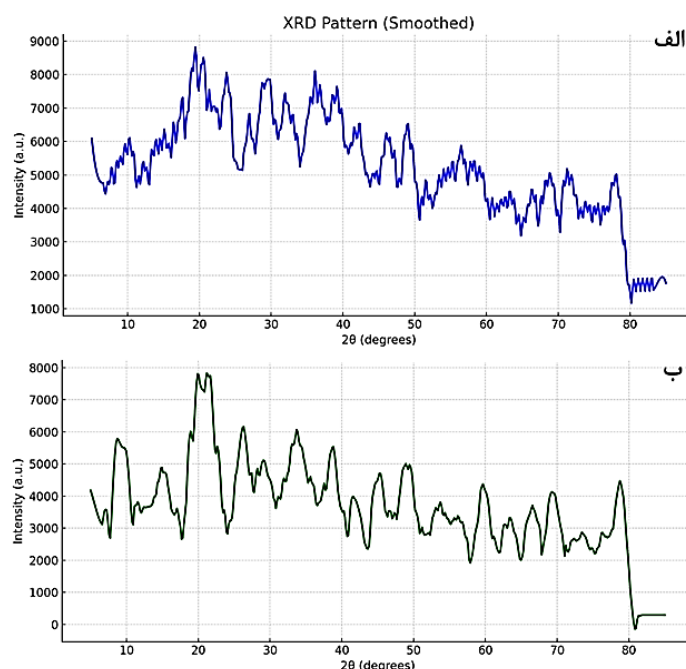
پهن<sup>۲</sup> حاکی از ساختار آمورف یا نیمه بلورین پروتئین استخراج شده است. الگوی پراش اشعه ایکس نمونه‌ی شیر پس چرخ (شکل ۲-ب)، در بازه‌ی زاویه‌ای  $5^{\circ}$  تا  $80^{\circ}$  نشان‌دهنده ساختاری با پراش مشخص و چندین پیک برجسته در زوایای مختلف است. پیک اصلی در حدود  $21-19^{\circ}$  با شدت بالا مشاهده می‌شود که معمولاً به فازهای بلورین مرتبط با پروتئین‌های شیر از جمله  $\alpha$ -لاکتالبومین و  $\beta$ -لاکتوگلوبولین نسبت داده می‌شود. همچنین، پیک‌های فرعی با شدت متوسط در نواحی  $2\theta$  حدود  $30^{\circ}$ ،  $45^{\circ}$  و  $55^{\circ}$  دیده می‌شوند؛ که بیانگر وجود فازهای بلوری جزئی یا باقی‌مانده‌های معدنی احتمالی است (۲۰).

### 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  $2\theta$  بین  $15^{\circ}$  تا  $35^{\circ}$  می‌باشد. در حدود زاویه  $20^{\circ}$  تا  $22^{\circ}$ ، یک پیک مشخص مشاهده می‌شود که معمولاً به الگوی صفحات بتای<sup>۱</sup> پروتئین‌های گیاهی نسبت داده می‌شود (۱۹). کاهش شدت پراش در زوایای بالای  $40^{\circ}$  نیز گواه بر نظم محدود و وجود نواحی نامنظم در ساختار مولکولی پروتئین است. عدم حضور پیک‌های تیز و باریک در الگو و وجود پیک‌های

<sup>2</sup> Broad Peaks

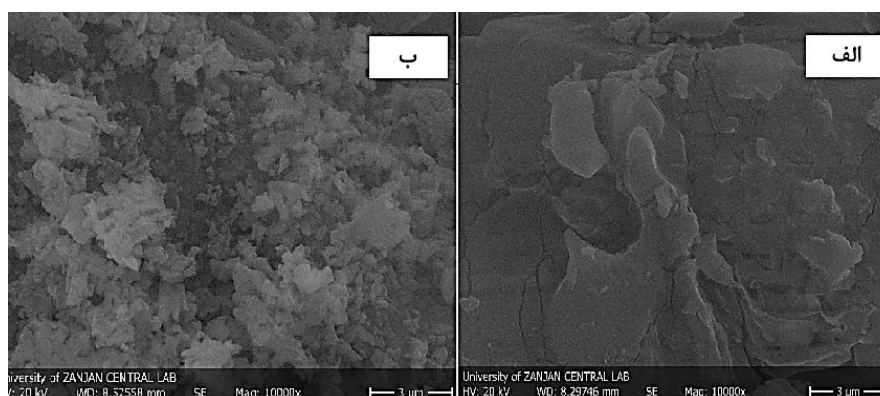
<sup>1</sup>  $\beta$ -sheet



شکل ۲- الگوی پراش اشعه ایکس نمونه‌های تهیه شده با ۱۰ درصد ایزوله پروتئین دانه‌ی کروشنه (الف) و شیر پس چرخ (ب) به صورت متراکم، یکنواخت و بدون حالت تکه‌تکه بودند (شکل ۳-الف). در مقابل، تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه‌های تیمار شده با شیر پس چرخ (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).

### میکروسکوپ الکترونی روبشی

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی ابزاری کارآمد برای ارزیابی ریزساختار و مورفولوژی سطحی ترکیبات محافظت انجمادی و سلول‌های پروبیوتیکی پس از فرآیند خشک کردن انجمادی به شمار می‌آیند. در این مطالعه، ساختار سطحی نمونه‌ی حاوی ۱۰ درصد ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه،



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه‌های تهیه شده با ۱۰ درصد ایزوله پروتئین دانه‌ی کروشنه (الف) و شیر پس چرخ (ب)

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

### بحث

زنده‌مانی لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس LA5 در طول مدت زمان نگهداری

۴°C و ۲۵ مورد بررسی قرار دادند. 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<sup>۳</sup> و همکاران (۲۲)، گزارش کردند که پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهای گیاهی مانند نشاسته‌ها، اینولین و سویا در برخی موارد، پایداری پروبیوتیک‌ها را به ویژه در دوره‌های نگهداری طولانی‌تر، بهتر از شیر پس چرخ 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  $3424/69\text{ cm}^{-1}$  که مربوط به پیوندهای هیدروژنی گروه‌های  $\text{OH}$  و  $\text{NH}_2$  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  $3415/69\text{ cm}^{-1}$  بیانگر حضور گروه‌های هیدروکسیل و آمینی با توانایی ایجاد

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 پایداتر برای سلول‌ها در طول فرآیند خشک کردن 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 در روز اول، زنده‌مانی باکتری‌ها در هر دو مورد مشابه بود ( $\text{CFU/mL}$ )  $1 \times 10^8$ ). با این حال 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 پس چرخ 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 خشک کردن انجمادی، زنده‌مانی باکتری‌ها در شیر پس چرخ به  $4 \times 10^7\text{ CFU/mL}$  کاهش یافت در حالی که 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 ( $9 \times 10^7\text{ CFU/mL}$ ). در نهایت ۴۲ روز بعد از خشک کردن انجمادی، زنده‌مانی در گروه شیرپس چرخ به  $9 \times 10^4\text{ CFU/mL}$  کاهش یافت در حالی که در گروه حاوی ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه ۱۰ درصد، زنده‌مانی به  $1 \times 10^7\text{ CFU/mL}$  رسید که باز هم نشان‌دهنده عملکرد بهتر این پروتئین نسبت به شیر پس چرخ 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 کاوونوپارات<sup>۱</sup> (۲۱)، محافظت انجمادی از *Lactobacillus fermentum* فرمنتوم<sup>۲</sup> 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

<sup>3</sup> Huang

<sup>1</sup> Kaewiad and Kaewnopparat

<sup>2</sup> *Lactobacillus fermentum* SK54

پیوند هیدروژنی با اجزای غشای سلولی می‌باشد. همچنین باندهای مشاهده شده در نواحی  $1403/17 \text{ cm}^{-1}$  و  $1034/28$  مربوط 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 پس چرخ از نظر ترکیب شیمیایی، ساختار مولکولی و گروه‌های عاملی فعال، گزینه‌ای مؤثر برای استفاده به عنوان محافظ انجمادی در فرمولاسیون پروبیوتیک‌ها به شمار می‌رود (۲، ۲۳).

#### XRD

ساختار XRD (شکل ۲) برای عملکرد محافظت انجمادی پروتئین دانه‌ی کروشنه، به‌ویژه در خشک کردن انجمادی، مطلوب ارزیابی می‌شود؛ زیرا ساختارهای آمورف تمایل کمتری به ترک خوردگی 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 از ساختار دارای نظم مولکولی مشخص هستند و در کنار 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 خشک کردن 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 به عنوان محافظ انجمادی در فرمولاسیون پروبیوتیک‌ها را دارند. با این حال، پروتئین شیر پس چرخ به دلیل 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 آمورف گونه 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 از ماهیت آمفی‌فیلیک این پروتئین و توانایی آن در ایجاد شبکه‌های پلیمری پایدار طی فرآیند انجماد و خشک کردن 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 پس چرخ مانند لاکتوز و کازئین‌ها 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 به عنوان 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  $4^{\circ}\text{C}$  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 خشک کردن انجمادی است. در مجموع، ایزوله‌ی پروتئین دانه‌ی کروشنه به دلیل ویژگی‌های ساختاری، عملکردی و گیاهی بودن، می‌تواند به عنوان جایگزینی طبیعی، اقتصادی و زیست‌سازگار برای پروتئین‌های متداول لبنی در فرمولاسیون‌های پروبیوتیکی مورد استفاده قرار گیرد.

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, Noisumtang C, Arunyanon 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

- 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.