



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology

E-ISSN: 3060-7647

13rd Year, Vol. 13, No. 51, 2024 pp. 97-128

Received: 10/04/2024

Accepted: 07/09/2024

(Research Paper)

Isolation, identification and encapsulation of microbes isolated from effluent of dairy factories by alginate and polysaccharides of *Lentinula edodes*

Mohammad Reza Mohammadi Afshar

¹ Master of Biotechnology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran

afsharm558@gmail.com

Mohaddeseh Larypoor ¹

² Associate Professor of Mycology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran

m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

Farzaneh Hosseini

³ Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran

farzaneh953@yahoo.com

Abstract

The use of microencapsulated probiotic bacteria, by maintaining the survival of probiotic bacteria during the production and storage process, produces high quality and long-lasting products. *Lentinula edodes* polysaccharide is a prebiotic that causes the growth and better performance of probiotics and helps to preserve the product for a long time. For this purpose, 20 samples were prepared from the wastewater of dairy factories around Tehran and 10 bacterial isolates and 10 yeast isolates were isolated from the samples based on biochemical, macroscopic and microscopic tests. Heat tolerance test, acid tolerance and resistance to bile salts and antibiogram were performed to measure the probiotic properties. The polysaccharides of *Lentinula edodes* were then extracted using a diethylaminoethyl Sephadex-25A ion exchange chromatography column and the amount of polysaccharide was determined using the phenol-sulphuric acid method. Fourier spectroscopy was used to detect biochemical compounds. Superior probiotic isolates were identified by PCR. The microencapsulation effect of superior isolates was investigated using sodium alginate and *lentinula edodes* polysaccharides on orange juice, apple juice and kombucha drink. *Kluyveromyces lactis* strain CBS 683 and *Lactobacillus brevis* strain 123-20 were identified and encapsulated with relative probiotic properties, growing more than in the free state. The shelf life and sensory characteristics of drinks containing bacteria and yeast encapsulated with sodium alginate and polysaccharide were also improved compared to the control group, and during 60 days of storage at 4°C, the bacteria and yeast survived and maintained their performance. The best protection was provided by encapsulated *Lactobacillus brevis* strain 123-20 in orange juice and apple juice. The use of native strains encapsulated with biocompatible compounds preserves the sensory characteristics of food, prevents food spoilage during storage by producing postbiotics and improves the function of the digestive system.

Keywords: Probiotic, Encapsulation, *Lentinula edodes*, Sodium alginate

¹ Corresponding Author



Introduction

Some microbes isolated from food sources, especially from fermented foods such as dairy products, pickles, etc., have probiotic properties, and, after laboratory testing, can be used in the food industry as probiotic food-pharmaceutical supplements. Encapsulation can be used to maintain function and quantity in various foods, especially beverages, fruit juices and soft drinks. Compounds from animal sources, such as chitosan, or plant sources, such as inulin and starch are among the most important of these, but because they are derived from food or animal sources, they pose a threat to human food security in the future. Researchers are therefore proposing the use of biopolymers isolated from algae, such as alginate, or mycobiopolymers isolated from fungi, such as lentinan. The fact that these polymers are produced from fungal or algal sources, and that they are cheap, available, quick and easy to cultivate and easy to extract, not only ensures human food security, but also that these compounds have no toxic effects and can be considered as prebiotic food supplements. By using microencapsulated probiotic microbes, it helps to maintain the number and survival of probiotic bacteria and yeasts during the production and storage process, producing high quality and long-lasting products. *Lentinula edodes* polysaccharide is a prebiotic that promotes the growth and performance of probiotics and helps to preserve the product for longer. This polysaccharide also helps to improve human health by improving the function of immune cells.

Materials and methods

Based on Cochran's formula, 20 samples were prepared from the effluents of dairy factories around Tehran. Bacterial colonies were then isolated and purified using nutrient agar and MRS agar media. Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Potato Dextrose Agar (PDA) and chrome agar Candida media were also used to isolate and purify yeasts and yeast-like organisms. Several passages were made to obtain a single colony. Then, based on biochemical, macroscopic and microscopic tests, 10 bacterial isolates and 10 yeast isolates were isolated and identified. Heat tolerance, acid tolerance, bile salt resistance and antibiotic sensitivity were tested using the antibiogram method to measure probiotic properties. The superior strains were identified by PCR method and then a phylogenetic tree was constructed using Mega 7 software. In the next step, the mycelium of *Lentinula edodes* mushroom was obtained from Iran Zemin Company and to prepare the mushroom culture bank, it was cultured on PDA and PDB medium and for 14 days at a temperature of 25 °C in a shaker incubator at a speed of 110 revolutions. Heat was transferred per minute. The biomass was then lyophilized. *Lentinula edodes* polysaccharides were extracted using a diethylaminoethyl-Sephadex-25A ion-exchange chromatography column and the amount of polysaccharide was determined by the phenol-sulphuric method. Fourier spectroscopy was used to detect biochemical compounds. The superior strains were finely coated with sodium alginate and *lentinula edodes* polysaccharides and the effect on orange juice, apple juice and kombucha drink was investigated.

Results

Based on the probiotic identification, two superior strains were isolated. Sequence blast results in the NCBI database and phylogenetic tree showed that the best bacterial strain with 94.03% similarity percentage was *Lactobacillus brevis* strain 123-20 and the best yeast strain with 97% similarity percentage was *Kluyveromyces lactis* strain 683CBS. The superior microcoated strains were fully grown after 48 hours of incubation, with a higher growth ratio compared to the non-microcoated strain. The shelf life and sensory characteristics of drinks containing bacteria and yeast encapsulated with sodium alginate and polysaccharide were also improved compared to the control group, and during 60 days of storage at 4°C, the bacteria and yeast survived and maintained their performance. The microencapsulated form of *Lactobacillus brevis* strain 123-20 provided the best protection in orange juice and apple juice. In industrial juices and kombucha drinks, the acidity decreased resulting in a more acidic taste and a reduction in product quality and sensory characteristics. The number of dissolved solids in industrial and natural juices microcoated with bacteria increased at the end of the storage

period compared to juices with only bacteria and yeast added, resulting in an increase in Brix. The number of soluble solids in industrial and natural juices microcoated with yeast at the end of the storage period also led to an increase in Brix in industrial orange and apple juices. The number of soluble solids in kombucha drink microencapsulated with bacteria and yeast decreased significantly at the end of the Brix storage period. The reason for the increase in soluble solids in the drink may be the presence of sugar compounds produced by these probiotics.

Conclusion and discussion

Considering the embargo conditions and the high cost of the strains produced abroad and considering that the local strains are available and cheaper, on the one hand, they are compatible with the geographical conditions of the country and their effectiveness in the long term. It is better to isolate, industrialize and commercialise indigenous strains from domestic sources. These strains can be isolated from specific geographical areas or from human or animal bodies or fermented foods. *Lentinula edodes* is one of the edible medicinal mushrooms that have been consumed orally for many years and whose medicinal properties have been recognized. As the polysaccharides of these mushrooms are not toxic, they can be used as dietary and medicinal supplements. Therefore, the use of native strains coated with biocompatible compounds preserves the sensory characteristics of the food and ,by maintaining the function of the probiotics, leads to the production of postbiotics such as a variety of enzymes, vitamins and antimicrobial compounds, which not only prevent food spoilage during storage, but also help to improve the function of the digestive system and human health .

جداسازی، شناسایی و ریزپوشانی میکروب‌های جدا شده از پساب کارخانجات لبنیات به وسیله آلزینات و پلی ساکاریدهای لنتینولا/دودس

محمد رضا محمدی افشار

دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

afsharm558@gmail.com

محدثه لاری پور *

گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

فرزانه حسینی

گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

farzaneh953@yahoo.com

چکیده

استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده، با حفظ بقای باکتری‌های پروبیوتیک در طی پروسه تولید و نگهداری، محصولاتی با کیفیت و عمر بالا تولید می‌کند. پلی ساکارید لنتینولا/دودس، پری بیوتیکی است که سبب رشد و عملکرد بهتر پروبیوتیک‌ها می‌شود و به نگهداری طولانی مدت محصول کمک می‌کند. ۲۰ نمونه از پساب کارخانجات لبنیات اطراف تهران تهیه شدند و بر اساس تست‌های بیوشیمیایی، ماکروسکوپی و میکروسکوپی، ۱۰ ایزوله باکتریایی و ۱۰ ایزوله مخمری جداسازی شدند. تست تحمل حرارت، تحمل اسید و مقاومت به نمک‌های صفرای و آنتی بیوگرام برای سنجش خصوصیات پروبیوتیکی انجام شد. پلی ساکاریدهای لنتینولا/دودس با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی دی اتیل آمینو اتیل سفادکس A-۲۵ استخراج شدند و با روش فنل سولفوریک اسید، مقدار پلی ساکارید مشخص شد. برای تشخیص اتصالات بیوشیمیایی طیف‌سنجی فوریه انجام شد. جدایه‌های برتر با استفاده از روش PCR شناسایی شدند. اثر ریزپوشانی جدایه‌های برتر با استفاده از آلزینات سدیم و پلی ساکاریدهای لنتینولا/دودس بر روی آب پرتقال، آب سیب و نوشیدنی کامبوچا بررسی شد. کلایوروماپسیس لاکتیس سویه CBS۶۸۳ و لاکتوباسیلوس بروویس سویه ۲۰-۱۲۳ با خصوصیات نسبی پروبیوتیکی شناسایی و ریزپوشانی شدند که نسبت به حالت آزاد رشد بیشتری داشتند. همچنین، ماندگاری و ویژگی‌های حسی نوشیدنی‌های حاوی باکتری و مخمر انکپسوله با آلزینات سدیم و پلی ساکارید نسبت به گروه شاهد بهبود یافتند و در مدت زمان ۶۰ روز نگهداری نوشیدنی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، باکتری و قارچ زنده ماندند و عملکرد آنها حفظ شد. بهترین عملکرد محافظتی را فرم ریزپوشانی لاکتوباسیلوس بروویس سویه ۲۰-۱۲۳ در آب پرتقال و آب سیب داشت. استفاده از سویه‌های بومی که با ترکیبات زیست سازگار ریزپوشانی شوند، موجب حفظ ویژگی‌های حسی ماده غذایی می‌شود و با تولید پست بیوتیک، از فساد مواد غذایی در طول دوره نگهداری، جلوگیری و سبب ارتقاء عملکرد دستگاه گوارش می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، ریزپوشانی، لنتینولا/دودس، آلزینات سدیم، پری بیوتیک

* نویسنده مسئول مکاتبات

محمدی افشار محمد رضا، لاری پور محدثه، حسینی فرزانه. جداسازی، شناسایی و ریزپوشانی میکروب‌های جدا شده از پساب کارخانجات لبنیات به وسیله

آلزینات و پلی ساکاریدهای لنتینولا/دودس. زیست‌شناسی میکروبی. ۱۴۰۳؛ ۱۳ (۵۱): ۹۷-۱۲۸. [doi: 10.22108/bjm.2024.141002.1590](https://doi.org/10.22108/bjm.2024.141002.1590)



مقدمه

پروبیوتیک^۱ میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به میزان کافی اثرات سودمندی بر سلامت میزبان خواهند داشت و غالباً از جنس باکتری‌های لاکتیک شامل لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم و مخمرهایی مانند ساکارومایسس هستند و از طریق مکانیسم‌های مختلفی همچون تولید مواد ضد میکروبی، تولید مهارکننده‌های مختلف و رقابت با پاتوژن‌ها عمل می‌کنند (۱). اثرات پروبیوتیک بر سلامت انسان عبارت‌اند از کاهش مقاومت لاکتوز، جلوگیری از بروز سرطان کولون، روده باریک، کبد و پستان، کاهش کلسترول خون و میزان جذب آن از روده (با تجزیه صفرا در روده)، کاهش فشار خون، بهبود و تقویت سیستم ایمنی و جلوگیری از عفونت‌ها، درمان و پیشگیری از اسهال حاد، کاهش التهابات روده‌ای، کاهش آلرژی غذایی یا اگرما در کودکان، بهبود جذب مواد معدنی و ویتامین‌ها، بهبود علائم نشانگان روده تحریک‌پذیر و کولیت، جلوگیری از رشد و تکثیر باکتری‌های مضر، درمان و پیشگیری از عفونت‌های مخمری مهبل، اسهال مرتبط با مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، آفت دهان، پوسیدگی دندان‌ها، واژینیت و عفونت‌های جلدی قارچی، برفک، بهبود عمل گوارش و جذب مواد غذایی و کمک به ساخت بیوتیک‌هایی مانند انواع ویتامین‌های گروه کا (۲).

در تحقیقات اخیر اعلام شده است محصولات پروبیوتیک به‌عنوان یک مکمل درمانی طبیعی و جایگزین مناسب برای برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها در سال‌های اخیر بوده‌اند (۳).

به نظر می‌رسد یافتن میکروارگانیسم مناسب و مهندسی ژنتیک یا پوشش‌دهی آنها می‌تواند راهکارهای مناسبی برای رفع آن ارائه کنند (۴).

ریزپوشانی^۲ یک فناوری مهم صنعتی برای به دام‌انداختن مایعات، جامدات و گازها در کپسول‌های بسیار کوچک است که برای مثال، پروبیوتیک‌ها، توسط ترکیبات دیواره پوشش داده می‌شوند تا محتویات داخل کپسول با سرعتی کنترل‌شده یا در شرایط خاص آزاد شوند و در عین حال، قدرت عملکردی میکروب ریزپوشانی‌شده نیز حفظ شود (۵). در این تکنیک، انواع طعم‌ها، اسانس‌ها، روغن‌ها، آنزیم‌ها، میکروارگانیسم‌ها و ... می‌توانند توسط ترکیبات بیوپلیمر مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، چربی‌ها پوشش داده شوند (۶). آلژینات‌های سدیم و پتاسیم^۳ از جمله مواد زیستی هستند که به دلیل سازگاری سلولی، سازگاری زیستی، زیست تخریب‌پذیری، خصوصیات انتقال رسوب‌دهی محلول^۴ و چندکاربرد بودن شیمیایی که امکان تغییرات بیشتری را برای سازگار کردن خواص آن ممکن می‌کند، برای انتقال دارو بررسی شده‌اند. آلژینات یک هتروپلی‌ساکارید خطی است که متشکل از D-مانورونیک‌اسید و L-گلوکونیک‌اسید است که در دیواره سلولی جلبک قهوه‌ای یافت می‌شود. وزن مولکولی آلژینات در محدوده ۹۲ تا ۱۷۷ کیلوگرم بر مول به همراه نسبت‌های مختلف G/M متفاوت است. آرایه‌های زنجیره براساس منبع استخراج و سن جلبک، منجر به تجاری‌سازی شدن بیش از ۲۷۷ نوع آلژینات شده‌اند. ویژگی اصلی آلژینات، توانایی آن در افزایش ویسکوزیته محلول‌های آبی است. توپین^۵ به‌عنوان امولسیفایر معمولاً به همراه آلژینات استفاده می‌شود و با اضافه کردن کلرید کلسیم امولسیون شکسته می‌شود و با عمل سانتریفیوژ میکروکپسول به دست می‌آید (۷). در این تکنیک، موادی مانند کاراگینان^۶، صمغ خرنوب، آلژینات، کیتوزان و ژلاتین، سلولزاستات، ژلاتین و

² Microencapsulation

³ Alginate

⁴ Chemical Solution Deposition

⁵ Tween80

⁶ Caraginan

¹ Probiotic

تست های کاتالاز و اکسیداز لاکتوباسیلوس ها نیز منفی است (۱۵). قارچ ها به چهار شکل مخمری، شبه مخمری، ساپروفیتی و کلاه دار دیده می شوند. مخمرها قارچ های تک سلولی اند که متعلق به زیرشاخه آسکومیکوتینا هستند و تعداد کمی از آنها بازیدیومیست هستند. ساکارومایسس سروریه مهم ترین مخمر صنعتی است که شامل دو گونه مشهور ساکارومایسس سروریزیه و ساکارومایسس بولاردی است که به عنوان مکمل دارویی - غذایی کاربرد دارد. ساکارومایسس سروریزیه مهم ترین مخمر برای تولید نان است که فرایند تبدیل قند به الکل و کربن دی اکسید را انجام می دهد (۱۶). قارچ ها به دلیل داشتن ترکیبات مختلف از جمله ویتامین های A، K، C، B1، B2، B6، بیوتین، پانتوتیک اسید^۵ و نیاسین برای سلامتی انسان مفید هستند و در درمان بیماری ها نیز استفاده می شوند (۱۵). قارچ کلاه دار خوراکی - دارویی از جمله *Lentinula edodes*^۶ متعلق به رده بازیدیومیست ها است و حاوی ترکیبات مهمی از جمله پلی ساکاریدهای لنتینان است که اثرات پری بیوتیکی و ضد سرطانی دارد. این قارچ نخستین بار در سال ۱۹۷۰ به وسیله کیهارا بررسی و مطالعه شد و پلی ساکارید ضد تومور موجود در آن جداسازی و مطالعه شد (۱۶). اثر ضد سلول های سرطانی از طریق فعال کردن سیستم ایمنی میزبان است که این نقش را توسط سلول های ایمنی مانند سلول های T، سلول های کشنده طبیعی و ماکروفاژها ایفا می کند. همچنین، این قارچ می تواند ایمنی میزبان را در برابر عفونت های باکتریایی افزایش دهد (۱۷). محققان از حلال هایی مانند کلروفرم و اتیل استات برای استخراج ترکیبات آنتی بیوتیکی از قارچ شیتا که علیه باکتری ها استفاده کرده اند (۱۴). لنتیونین یک ترکیب ارگانوسولفو از قارچ *Lentinula edodes*^۶ است که حلقوی است که اثرات مهاری این ترکیب علیه باکتری هایی مانند

زانتان^۱ استفاده می شوند. در این تکنیک، اندازه دانه ها در مقایسه با اکستروژن کوچک تر است که از این تکنیک برای ریزپوشانی باکتری های اسید لاکتیک^۲ استفاده می شود و با این تکنیک می توان لاکتوباسیلوس *Delbruckii* را ریزپوشانی کرد (۸). افزون بر آن، کارایی تحویل دارو توسط آلژینات تحت شرایط نسبت G/M، وزن مولکولی، غلظت و اسیدیته محیط است (۹). آنچه اهمیت دارد این است که ریزپوشانی باعث حفظ فعالیت های پروبیوتیکی در دستگاه گوارش و آزادسازی ایمن آنها در نقاط خاص بدن می شود (۱۰). ریزپوشانی با استفاده از آلژینات و کاراگینان از قبل استفاده می شد (۱۱).

لاکتوباسیلوس ها با سیل گرم مثبت با اندازه ده میکرون، بدون اسپور و عمدتاً غیر متحرک هستند که از طریق تخمیر قندها تولید انرژی می کنند که دست کم نیمی از فرآورده های آن اسید لاکتیک است. لاکتوباسیل ها با تولید ترکیباتی سبب مهار برخی از میکروارگانیسم های بیماری زا مانند *Salmonella*، *Shigella* و *Helicobacter* می شوند (۱۲). این ترکیبات، سبب افزایش پاسخ ایمنی و کاهش عدم تحمل لاکتوز در انسان می شوند (۱۳). بهترین شرایط رشد لاکتوباسیلوس ها pH ۵ تا ۶/۵ است و غلظت ۵ درصد کربن دی اکسید است. لاکتوباسیلوس ها در محیط تیوگلیکولات^۳ از کوکسی به باسیل تغییر شکل می دهند. گونه تیپ لاکتوباسیلوس *Delbruckii*^۴ که در جاهای مختلفی، از جمله دستگاه تناسلی پستانداران تا روی سطح فرآورده های گیاهی وجود دارد، نمونه بارزی از شرایط رشد مناسب برای لاکتوباسیلوس است (۱۴). در روش رنگ آمیزی آلبرت، دانه های متاکروماتیک به رنگ آبی تا قهوه ای و لاکتوباسیلوس به رنگ سبز مشاهده می شوند. نتیجه

¹ Gelatin and xanthan

² Lactic acid

³ Thioglycollate

⁴ *Lactobacillus delbruckii*

⁵ Pantothenic acid

⁶ *Lentinula edodes*

شده است.

روش کار

نمونه‌برداری از پساب کارخانجات لبنیات

به‌منظور نمونه‌برداری براساس فرمول کوکران، ۲۰ نمونه از پساب کارخانجات لبنیات اطراف شهر تهران با حجم ثابت یک لیتر در فالكون‌های ۲۰ cc از خروجی حوض متعادل‌ساز انجام شد (۳ بار نمونه‌برداری). سپس در لوله‌های ۵ cc، سانتریفیوژ و کشت داده شد (۲۲).

کشت نمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت

اختصاصی

برای جداسازی باکتری‌های لاکتیک، نمونه‌های لبنیات بر روی محیط MRS آگار کشت داده شدند و به‌مدت ۴۸ ساعت در دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون جار بی‌هوای قرار داده شدند و برای جداسازی مخمرها از محیط کشت پتیتودکستروز آگار استفاده شد و پلیت‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند.

شناسایی مورفولوژی، میکروسکوپی و

بیوشیمیایی باکتری‌های لاکتیک

رنگ، مورفولوژی، شکل و حالت کلنی و خصوصیات میکروسکوپی با رنگ‌آمیزی گرم بررسی و ثبت شدند. نمونه استاندارد لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس ۴۷۶۸ برای انجام آزمون‌هایی تأییدی ایزوله‌ها و تست‌های پروبیوتیکی در طول آزمایشات استفاده شد. برای هر ایزوله خالص‌سازی شده تست جذب و تخمیر قند، تست جذب ازت، تست کاتالاز و تست اکسیداز انجام شد.

شناسایی مورفولوژی، میکروسکوپی و

بیوشیمیایی مخمر

رنگ، مورفولوژی، شکل و حالت کلنی بر روی محیط کشت پتیتودکستروز آگار و کروم آگار کاندیدا بررسی شدند. لام‌ها با استفاده از لاکتوفنل کاتن بلو رنگ‌آمیزی

استافیلوکوکوس اورئوس^۱، باسیلوس سوبتیلیس^۲ و اشیریشیا کلی^۳ اثبات شده‌اند. این قارچ اثراتی مانند تنظیم سطح گلوکز خون، محافظت از کبد، کاهش کلسترول، بالابرنده سطح ایمنی بدن، کاهش لیپوپروتئین‌های با چگالی بسیار کم و لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا را نشان داده است و می‌تواند از افزایش فشارخون جلوگیری کند. همچنین، این قارچ خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی را کاهش می‌دهد. این عملکرد به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تعدیل سیستم ایمنی اعمال شده توسط این دسته از مکمل‌های غذایی است. اریتادین ترکیب لیپیدی است و لیپوپروتئین‌های سرم خون را نیز در حیوانات و انسان کاهش می‌دهد. طبق گفته ایزودا و همکاران، تجویز خوراکی این ترکیب مؤثر است و سمیت کمی دارد؛ اما متأسفانه تنها ۱۰ درصد آن در دستگاه گوارش جذب می‌شود و به‌عنوان تزریق داخل وریدی، کاملاً بی‌اثر است؛ زیرا به‌سرعت از گردش خون توسط کلیه‌ها خارج و دفع می‌شود (۱۸). پلی‌ساکاریدهای لنتینولا/دودس^{۱۶} فعالیت‌های زیستی متنوعی از خود نشان می‌دهند که بیشترین مورد در ارتباط با فعالیت‌های ضد تومور و سیستم ایمنی بدن است و تعیین شده است که بخش‌های پلی‌ساکاریدی این قارچ قادر به مهار طیف گسترده‌ای از سلول‌های سرطان‌زا و همچنین، القا آپتوز در سلول‌های تومور هستند (۱۹). با این حال، عصاره این قارچ به‌همراه شیمی درمانی اثر تقویت‌کننده درمانی دارد (۲۰، ۲۱). در این مطالعه، به جداسازی و شناسایی میکروب‌ها از پساب کارخانجات لبنیات، بررسی خصوصیات پروبیوتیکی این میکروب‌ها و ریزپوشانی آنها با استفاده از پلی‌ساکارید قارچ خوراکی دارویی لنتینولا/دودس و آلزینات پرداخته شده است و تأثیر پری‌بیوتیکی آن بر روی میزان محافظت و عملکرد پری‌بیوتیک‌ها سنجیده

¹ *Staphylococcus aureus*

² *Bacillus subtilis*

³ *Escherichia coli*

بررسی مقاومت به شرایط اسیدی و قلیایی

سوسپانسیون استاندارد ایزوله‌های مخمر و باکتریایی به محیط کشت سابورو دکستروز براث و MRS براث اضافه شد. با استفاده از هیدروکلریک اسید ۱ نرمال و سدیم هیدروکسید، اسیدیته ۱/۵، ۲، ۳ و ۵ برای هر دو محیط تنظیم شد. محیط‌ها بعد از تنظیم اسیدیته، اتوکلاو شد و بعد از اتمام آن و خنک شدن محیط‌ها، سوسپانسیون استاندارد ایزوله‌های باکتریایی و مخمری به آن اضافه شد. سپس در ساعت‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۲۵nm خوانش انجام شد (۲۴).

بررسی مقاومت به نمک‌های صفاوی

سوسپانسیون استاندارد ایزوله‌های مخمر و باکتریایی به محیط کشت سابورو دکستروز براث و MRS براث اضافه شد. نمک‌های صفاوی (سدیم کولات و سدیم دزوکسیکولات) به مقدار ۰/۳ درصد به هر دو محیط اضافه شدند. سپس محیط‌ها اتوکلاو شد و سوسپانسیون استاندارد ایزوله‌های باکتریایی و مخمری به آن اضافه شد. سپس در ساعت‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۲۵nm خوانش انجام شد (۲۴).

شناسایی مولکولی

سویه‌های برتر از نظر خصوصیات نسبی پروبیوتیکی برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند. ابتدا استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت ژنیران انجام شد. برای اطمینان از صحت استخراج DNA با استفاده از سیستم الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز ۱ درصد درون TBE (بافرتریس بوراتایدیوم بروماید) الکتروفورز شد. سپس با استفاده از دستگاه ژل داگ صحت نمونه ژن استخراج شده تأیید شد. پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش (با استفاده نرم افزار ژن رانر و سایت NCBI) بر طبق مقالات و توسط شرکت ژنیران طراحی شدند که در جدول ۱ نشان داده شده‌اند.

و مشاهده شدند (۲۳). تست‌های تکمیلی جذب و تخمیر قندها، تست جذب ازت، تست تولید آسکواسپور و تست لوله زایا انجام شد. تمام تست‌ها برای استانداردسازی با سویه استاندارد ساکارومایسس سرویزیه GITA۵۵۱ انجام شدند.

انجام تست‌های تخمین خصوصیت پروبیوتیکی

برای انجام تست‌های ذیل از سوسپانسیون استاندارد مطابق نیم مک فارلند (جذب ۰/۱ تا ۰/۰۸ در طول موج نانومتر ۶۲۵ معادله $1.5 \times 810 \text{ CFU/ml}$) استفاده شد. همه تست‌ها سه بار تکرار شدند و در نهایت، منحنی رشد ایزوله‌ها رسم شد.

تست آنتی‌بیوگرام

برای انجام این تست از محیط مولر هیتون آگار استفاده شد و براساس استاندارد CLSI2021، میزان حساسیت و مقاومت سویه‌های باکتریایی و مخمری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد براساس قطر هاله عدم رشد اندازه گرفته شد. ایزوله‌هایی که حساسیت بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها داشتند برای تست‌های بعدی انتخاب شدند. دیسک‌های فلوکونازول، کتوکونازول، نیستاتین و آمفوتریپسین B برای سویه‌های مخمر و دیسک‌های تراسایکلین، کلیندامایسین، جنتامایسین، کلرامفنیکل، استریتومایسین و ونکومایسین برای سویه‌های باکتری استفاده شدند.

بررسی مقاومت به حرارت

سوسپانسیون استاندارد ایزوله‌های مخمر و باکتریایی به محیط کشت سابورو دکستروز براث و MRS براث اضافه شد و در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس در ساعت‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ میزان رشد آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۲۵nm خوانش انجام شد.

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی طراحی شده برای شناسایی مولکولی برای مخمر و باکتری

Table 1. Nucleotide sequence designed for molecular identification for yeast and bacteria

| Nucleotide sequence of 18srRNA for yeast | | (bp) | T _m (C°) | Source |
|---|----------------------|------|---------------------|---------------|
| Forward | AGCTGGTTGATTCTGCCAG | 19 | 53 | current study |
| Reverse | TGATCCTCCYGCAAGTTCAC | 20 | 53 | |
| Nucleotide sequence of 16srRNA for bacteria | | (bp) | T _m (C°) | Source |
| Forward | AGAGGTTCTGAGCTCAG | 19 | 53 | current study |
| Reverse | ACAGCTTCCTGTTACGATT | 20 | 53 | |

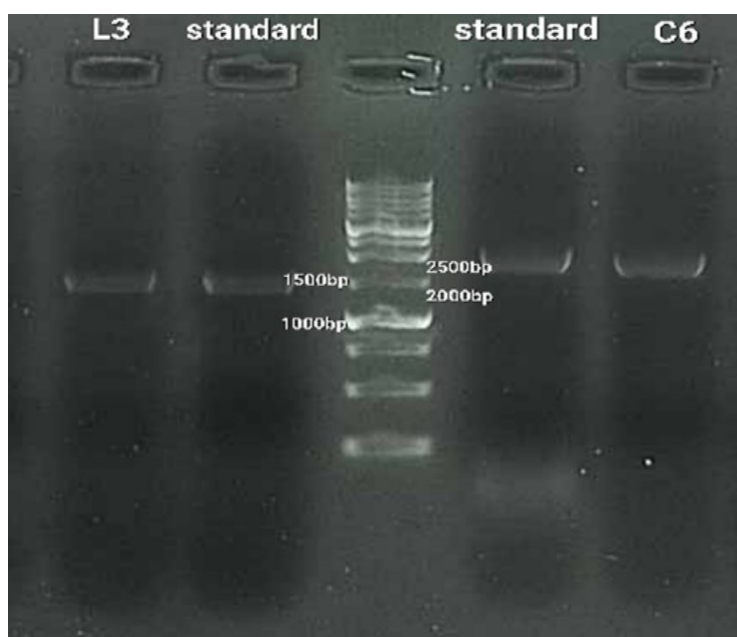
سپس بر طبق برنامه دمایی **جدول ۲** الف وب Taq 2x MASTER MIX (شرکت امپلیکون دانمارک) را اضافه و داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده می‌شود. همچنین در **شکل ۱** تصویر مربوط به ژل الکتروفورز جدایه باکتری (L3) و جدایه مخمری (C6) نشان داده شده است.

جدول ۲. برنامه زمان بندی PCR برای الف) مخمر ب) باکتری

Table 2. PCR schedule for a) yeast b) bacteria

| ردیف ب | تعداد چرخه | زمان | دما |
|--------|------------|----------|-------------|
| ۱ | ۱ | ۳ دقیقه | ۹۵ درجه اول |
| ۲ | ۳۵ | ۲۰ ثانیه | ۹۵ درجه دوم |
| ۳ | ۳۵ | ۲۰ ثانیه | ۵۲ درجه |
| ۴ | ۳۵ | ۲۰ ثانیه | ۷۲ درجه اول |
| ۵ | ۱ | ۳ دقیقه | ۷۲ درجه دوم |

| ردیف الف | تعداد چرخه | زمان | دما |
|----------|------------|--------------------|-------------|
| ۱ | ۱ | ۳ دقیقه | ۹۵ درجه اول |
| ۲ | ۳۵ | ۳۰ ثانیه | ۹۵ درجه دوم |
| ۳ | ۳۵ | ۲۰ ثانیه | ۵۵ درجه |
| ۴ | ۳۵ | ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه | ۷۲ درجه اول |
| ۵ | ۱ | ۵ دقیقه | ۷۲ درجه دوم |



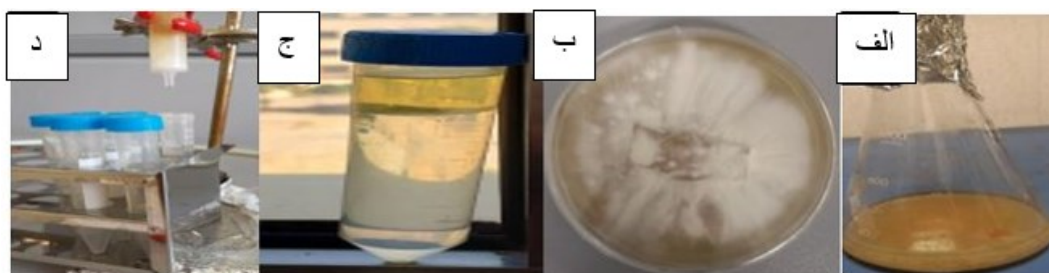
شکل ۱. ژل الکتروفورز جدایه باکتری (L3) و جدایه مخمری (C6)

Figure 1. Gel electrophoresis of bacterial isolates (L3) and yeast isolates (C6)

استخراج پلی ساکاریدهای قارچ *لنتینولا اودوس*

قارچ *لنتینولا اودوس* از شرکت ایران زمین تهیه شد. سپس بر روی محیط پتینودکستروز آگار و پتینودکستروز برات کشت انجام شد و به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه گرماگزاری شد که در شکل ۲ مشاهده می شود. پس از آن به منظور تهیه بیومس از فرآیند لیوفیلزاسیون به مدت ۲۴ ساعت در فشار ۶۵ بار در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد استفاده شد. به منظور استخراج پلی ساکارید از روش فنل سوافوریک اسید استفاده شد و با استفاده از معرف سویچ تعیین حجم شد. در شکل ۲

ج تشکیل سه لایه مختلف (لایه رسوبی میانی حاوی پروتئین) در حین استخراج به نمایش گذاشته شده است (۲۵). برای خالص سازی بیشتر پلی ساکارید استخراج شده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی دی اتیل آمینو اتیل سفادکس A-۲۵ استفاده شد. ستون با یک شیب خطی از محلول ۰ تا ۰/۲ مولار نمک طعام با جریانی با سرعت ۰/۴۴ میلی لیتر در دقیقه شسته شد و ذره های کوچک خروجی با میکروتیوپ به مقدار ۲ میلی لیتر در هر یک، جمع آوری و به منظور تعیین غلظت بررسی شدند (۲۶) (شکل ۲د). نهایتاً شناسایی ساختار پلی ساکارید استخراج شده با روش تبدیل فوری مادون قرمز از ۱۴۰۰۰ cm تا ۱۶۵۰۰ cm با قدرت تفکیک ۱۱ cm ثبت و محل پیوندها بر روی پیک ها تعیین شد.



شکل ۲ الف) و ب) میسلیم قارچ بر روی محیط مایع و جامد PDA، ج) تشکیل سه لایه مختلف در حین استخراج، د) ستون کروماتوگرافی تعویض یونی دی اتیل آمینو اتیل سفادکس A-۲۵

Figure 2. a) and b) mushroom mycelium on liquid and solid PDA media, c) formation of three different layers during extraction, d) diethylaminoethyl sephadex 25A ion exchange chromatography column

سیگما - آلد ریچ آمریکا تهیه شد. ابتدا ۳ گرم آلژینات سدیم (شرکت سیگما - آلد ریچ آمریکا) و ۲ گرم پلی ساکاریدهای *لنتینولا اودوس* به آرامی به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شدند. پس از حل شدن در اتوکلاو استریل شدند. پس از آنکه محلول با محیط هم دما شد، محلول آلژینات با سوسپانسیون (۰/۱ درصد) میکروبی به مدت ۵ دقیقه مخلوط شد تا همگن شود. برای تشکیل امولسیون، مخلوط حاصل به ۲۵۰ میلی لیتر روغن زیتون حاوی ۰/۲ درصد امولسیفایر تئوین ۸۰ (شرکت مرک، آلمان) ریخته شد. با استفاده از همزن

آماده سازی ترکیب ریزپوشانی کننده آلژینات و پلی ساکاریدهای *لنتینولا اودوس*

جدایه های شناسایی شده شامل باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* ۲۰-۱۲۳ و گونه مخمر *کلایورومایسس لاکتیس CBS ۶۸۳* است که برای ریزپوشانی استفاده شدند و با گونه استاندارد مخمر *ساکارومایسس سرویزیه GIT۵۵۱* و گونه استاندارد باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۴۷۶۸* مقایسه شدند.

پس از خالص سازی پلی ساکاریدهای *لنتینولا اودوس*، پودر آلژینات سدیم برای ریزپوشانی از شرکت

خوانش انجام شد.

بررسی مقاومت به شرایط اسیدی و قلیایی نمونه‌های ریزپوشانی

برای انجام این تست، محیط کشت سابورو دکستروز براث و MRS براث ساخته شد. با استفاده از هیدروکلریک اسید ۱ نرمال و سدیم هیدروکسید، اسیدیته ۱/۵، ۲، ۳ و ۵ برای هر دو محیط تنظیم شد. محیط‌ها بعد از تنظیم اسیدیته، اتوکلاو شدند و بعد از اتمام آن و خنک شدن محیط‌ها، هر یک از ایزوله‌های باکتریایی و مخمیری به آن اضافه شدند. سپس در ساعت‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانش انجام شد.

بررسی تولید اسیدلاکتیک (یک پست بیوتیک)

برای سنجش لاکتات از کیت آنزیمی تشخیصی، طبق رقت‌های موجود در دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد و در جذب نوری ۵۴۶ نانومتر و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نیز با گذشت زمان ارزیابی شدند. آنزیم لاکتات اکسیداز لاکتات را به پیرووات و پراکسید هیدروژن در حضور پراکسیداز با ۴-آمینوآنتی‌پیرین و تروت - بوتیل هیدروپراکسید (TBh) واکنش داده و ترکیب قرمزرننگ چینونیمین تولید می‌شود. افزایش رنگ تولیدشده با غلظت لاکتات موجود در نمونه متناسب است. نحوه محاسبه غلظت لاکتات از فرمول زیر به دست می‌آید:

غلظت لاکتات = (تفاوت جذب نمونه) / (تفاوت جذب استاندارد) × غلظت استاندارد

لاکتات (mmol/l) = (mg/dl) × 0.11 = لاکتات

آماده‌سازی نوشیدنی آب پرتقال، آب سیب و نوشیدنی کامبوچا

آبمیوه‌های صنعتی پرتقال، آب سیب تجاری و طبیعی

مغناطیسی (سرعت ۵۰۰ rpm) به مدت ۳۰ دقیقه امولسیون یکنواختی تشکیل شد. به منظور تشکیل کپسول‌ها به محلول مدنظر، کلرید کلسیم ۰/۱ مولار اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه که کپسول‌ها ته‌نشین شدند، به منظور جداسازی کپسول‌ها از سانتریفوژ (۱۷۷۰ rpm) به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. کپسول‌های جداشده با محلول آب پپتونه ۰/۱ درصد، شسته و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شمارش باکتری‌ها و مخمرهای به‌دام‌افتاده در کپسول

۱ گرم از کپسول‌های تهیه‌شده با ۹ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار استریل بافر فسفات به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق هم‌زده شد تا کپسول‌ها به‌طور کامل حل و آزاد شوند. سپس باکتری‌ها در محیط MRS و مخمرها در محیط پتینودکستروز آگار کشت داده شدند. باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مخمرها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. شمارش باکتری‌ها در ۳ تکرار انجام شد.

بررسی شکل و اندازه کپسول‌ها

شکل ذرات به‌وسیله میکروسکوپ نوری مدل (Motic BA300) با بزرگنمایی ۴۰ بررسی شد. برای تعیین اندازه ذرات از میکروسکوپ اینورت استفاده شد.

بررسی مقاومت به حرارت نمونه‌های ریزپوشانی

ابتدا از سوسپانسیون استاندارد ایزوله‌های مخمر و باکتریایی ریزپوشانی‌شده به محیط کشت سابورو دکستروز براث و MRS براث اضافه شد؛ به طوری که کدورت محیط بعد از اضافه‌شدن سوسپانسیون استاندارد برابر با نیم مک فارلند باشد. محیط کشت‌های مدنظر در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۲ سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس در ساعت‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر

جدایه های کاندیدا آلیکنس مشاهده می شود.

نتایج تست های بیوشیمیایی

تست های تخمیر قند، احیا نیترات، کاتالاز و اکسیداز برای جدایه های باکتری و قارچ انجام شدند.

نتایج تست آنتی بیوگرام جدایه ها در مقایسه با نتایج تست آنتی بیوگرام جدایه های انتخابی

ریزپوشانی

اندازه قطر هاله ها در جدایه های قارچی و باکتریایی بررسی شد. جدایه L3 در برابر ونکومايسين بدون هاله عدم رشد، تتراسایکلین ۲۰mm، استرپتومايسين بدون هاله، کلرامفنیکل ۳۵mm (حساس)، کلیندامایسین ۳۰mm (حساس) و جنتامایسین ۹mm (نیمه حساس) بود. در جدایه C6، قطر هاله کتوکونازول ۳۵mm (حساس)، آمفوتریسین B ۹mm (نیمه حساس)، نیستاتین ۳۰mm (حساس)، فلوکونازول ۴۰mm (حساس) و ایتراکونازول بدون هاله عدم رشد بود. در نمونه ریزپوشانی، اندازه قطر هاله ها در جدایه C6 قطر هاله کتوکونازول ۳۷mm (حساس)، آمفوتریسین B ۲۱mm (حساس)، نیستاتین بدون هاله (مقاوم) و فلوکونازول بدون هاله (مقاوم) بود و نسبت به نمونه غیرریزپوشانی تغییر خاصی اتفاق نیفتاده است. در جدایه L3، قطر هاله ونکومايسين، استرپتومايسين، تتراسایکلین، جنتامایسین و کلیندامایسین هر ۵ آنتی بیوتیک بدون هاله (مقاوم) بود که نمونه در وضعیت ریزپوشانی مقاوم شده بود. تست آنتی بیوگرام در شکل ۴ مشاهده می شود.

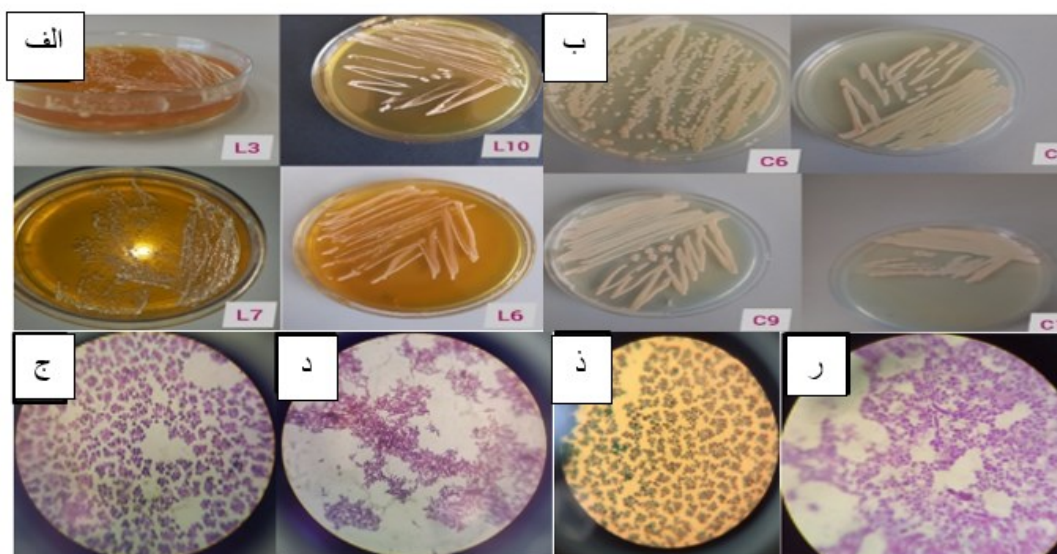
تهیه شدند و نوشیدنی طبیعی کامبوچا از آزمایشگاه قارچ شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال تهیه شد. سپس آنها با استفاده از شکر و آب از بریکس ۷۰ به بریکس ۱۲، رسانده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی گراد پاستوریزه شدند. روند تغییرات اسیدیته در طول مدت نگهداری آب میوه ها با پروبیوتیک توسط دستگاه سنجش اسیدیته اندازه گیری شد. میزان مواد جامد محلول در آب یا بریکس توسط دستگاه رفاکتومتر اندازه گیری شد. سپس نمونه های نوشیدنی از لحاظ طعم، عطر، بافت و رنگ به صورت مقایسه ای بررسی شدند. برای شست و شوی ذائقه و طعم بین نمونه ها از آب استفاده شد. براساس مقیاس هدونیک، ۱ برای نمونه ضعیف و ۱۰ برای نمونه عالی اختصاص داده شد.

نتایج

نتایج نمونه برداری، خالص سازی و مشاهده

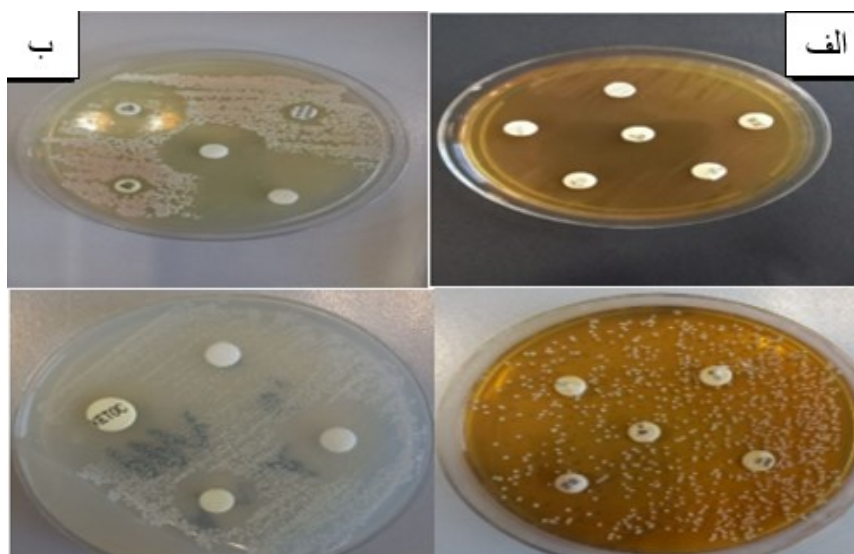
میکروسکوپی

پس از نمونه برداری و خالص سازی، ۱۰ جدایه باکتری (L1-L10) و ۱۰ جدایه مخمری (C1-C10) جدا شدند که کشت خالص و شکل میکروسکوپی برخی از آنها در شکل ۳ الف و ب مشاهده می شوند. همچنین، شکل میکروسکوپی مخمر (شکل ۳ ج) و جدایه باکتری (د) با رنگ آمیزی گرم مشاهده می شوند. نتیجه مثبت تست آسکوسپور (شکل ۳ ذ) که در آن آسکواسپور به رنگ آبی مایل به سبز و سلول های زایا به رنگ قرمز مشاهده می شوند. همچنین، در شکل ۳ ر نیز تشکیل لوله زایا در



شکل ۳. الف) مورفولوژی بعضی از جدایه‌های باکتری و ب) قارچ جداشده از لبنیات، ج) مخمر به صورت میکروسکوپی با لنز ۱۰۰، د) باکتری لاکتیک به صورت میکروسکوپی با لنز ۱۰۰، ذ) تست مثبت آسکوسپور، ر) تست مثبت لوله زایا

Figure 3. a) Morphology of some isolates of web bacteria fungus isolated from dairy, c) yeast microscopically with 100 lens, d) lactic bacteria microscopically with 100 lens, g) ascospore positive test, d) germ tube positive test



شکل ۴. الف) تست آنتی‌بیوگرام نمونه L3 باکتری، ب) تست آنتی‌بیوگرام نمونه C6 مخمر (بالا) و نمونه‌های ریزپوشانی (پایین)، الف) نمونه ریزپوشانی L3 باکتری، ب) نمونه ریزپوشانی C6 مخمر

Figure 4. a) Antibiofilm test of bacterial L3 sample, b) Antibiofilm test of yeast C6 sample (top) and microencapsulation samples (bottom), a) bacterial L3 microencapsulation sample, b) yeast C6 microencapsulation sample

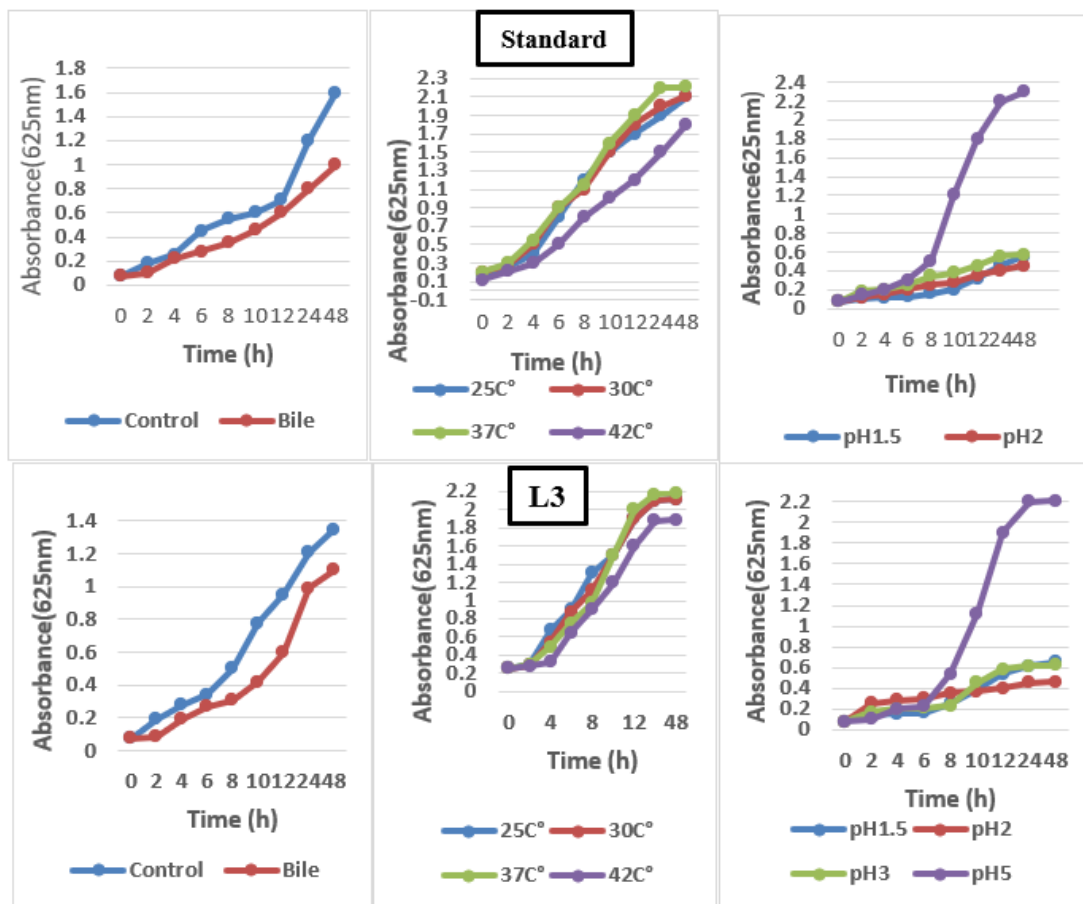
pH~۵ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بهترین میزان رشد را داشت و در حضور نمک صفراوی کاهش چشمگیری در رشد ایجاد شد. جدایه L3 در pH~۵ و

نتایج تست‌های پروبیوتیکی

منحنی رشد لاکتوباسیلوس استاندارد در محدوده دما، نمک صفراوی و اسیدیته رسم شد. نمونه استاندارد در

مشخص کردن خصوصیات نسبی پروبیوتیک مقایسه شدند که در شکل ۵ مشاهده می‌شوند.

دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بهترین رشد را داشت و در حضور نمک صفراوی توانایی رشد داشت. این نمودارها با منحنی رشد جدایه باکتری برای

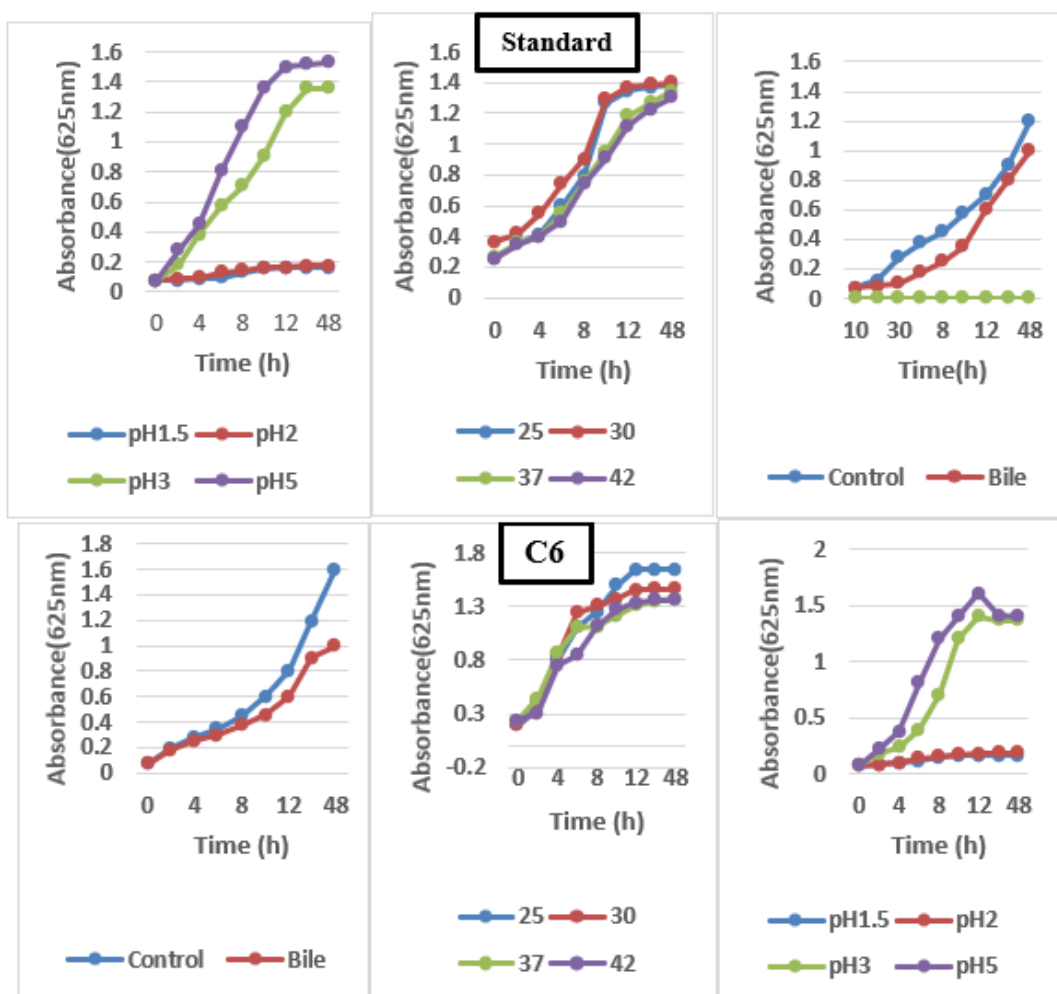


شکل ۵. منحنی رشد لاکتوباسیلوس استاندارد (بالا) و جدایه باکتری L3 (پایین) در محدوده دما، نمک صفراوی و اسیدیته

Figure 5. The growth curve of *Lactobacillus* standard (top) and bacterial isolate L3 (bottom) in the range of temperature, bile salt and acidity

داشت و همچنین، pH ۳ رشد بهتری نسبت به pH ۲، pH ۱/۵ داشت و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۵ درجه سانتی‌گراد که رشد نسبتاً نزدیکی به هم داشتند، بهترین رشد و سازگاری را نسبت به دماهای دیگر داشت. رشد در حضور نمک صفراوی نشان داد جدایه C6 مدنظر توانایی رشد با حضور این نمک را دارد. نتایج در شکل ۶ مشاهده می‌شوند.

نمونه استاندارد مخمیری در pH و دماهای متفاوت در حضور نمک صفراوی با دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد. نمونه استاندارد در pH ۵ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۵ درجه سانتی‌گراد که رشد نسبتاً نزدیکی به هم داشتند، بهترین رشد و سازگاری را نسبت به دماهای دیگر داشت. رشد در حضور نمک صفراوی نشان داد سویه استاندارد مدنظر توانایی رشد با حضور این نمک را دارد. جدایه C6 در pH ۵ بهترین رشد را



شکل ۶. منحنی رشد مخمر استاندارد (بالا) و جدایه مخمری C6 (پایین) در محدوده دما، نمک صفرای و اسیدیته

Figure 6. The growth curve of standard yeast (top) and C6 yeast isolate (bottom) in the range of temperature, bile salt and acidity

بوت استرپ باکتری و مخمری و فاصله تکاملی با استفاده از روش ماکزیمم لایک لیهود در نمونه باکتری ۰/۰۲ و در نمونه مخمری ۰/۰۲ محاسبه شده‌اند. براساس آنالیز توالی‌ها به صورت ۱۰ نوکلئوتیدی، گونه‌های زیر شناسایی شدند:

(L3) *Lactobacillus brevis* strain 123-20

Lactobacillus acidophilus strain 4768

(standard)

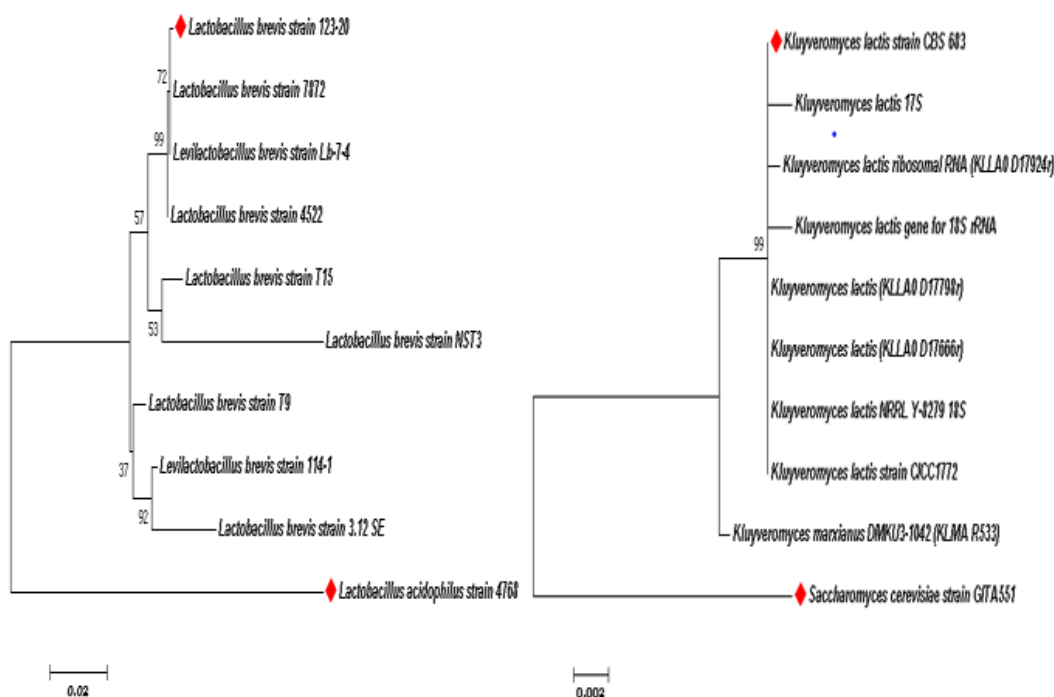
نتایج شناسایی مولکولی

نتایج بلاست توالی در پایگاه داده NCBI نشان دادند ایزوله باکتری با درصد تشابه ۹۴/۰۳ درصد به عنوان لاکتوباسیلوس برویس^{۱۷} سویه ۲۰-۱۲۳ و ایزوله مخمر با درصد تشابه ۹۷ درصد به عنوان کلایورومایسس لاکتیس^{۱۸} سویه CBS ۶۸۳ شناسایی شدند. همچنین، درخت فیلوژنی این سویه‌ها با استفاده از روش ماکزیمم لایک لیهود رسم شد.

درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار مگا ۷ رسم شد

¹⁷ *Lactobacillus brevis*

¹⁸ *Kluyveromyces lactis*



شکل ۷. درخت فیلوژنی جدایه باکتری L3 و مخمر C6 (Maximum likelihood method)

Figure 7. Phylogeny tree of bacteria isolate L3 and yeast C6 (Maximum likelihood method)

کوتاه است. جایگاه مخمرهای جدا شده در درخت فیلوژنتیکی، گونه‌های کلاپورومایسس لاکتیس سویه ۶۸۳ و کلاپورومایسس لاکتیس سویه 17S قرابت بیشتری نسبت به هم دارند و دارای جد مشترک هستند. نتایج در شکل ۷ نشان داده شده‌اند.

نتایج ریزپوشانی نمونه‌های جداسازی شده

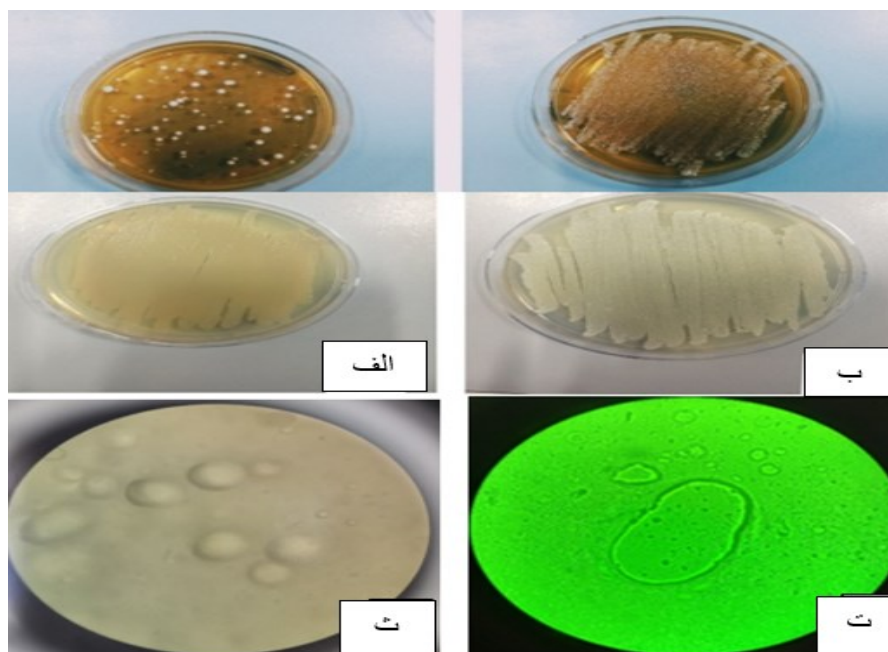
همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، نمونه ریزپوشانی بر روی محیط اختصاصی کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت کلنی‌ها رشد کرد و این نشان از زندمانی جدایه‌ها بود. در شکل ۸ عکس میکروسکوپ اینورت نشان از تشکیل کپسول اطراف نمونه باکتریایی است.

با توجه به درخت فیلوژنتیکی رسم شده، طول شاخه‌های داخلی با توجه به مقیاس ۰/۰۱ بسیار کوتاه است. با توجه به جایگاه باکتری‌های جدا شده در درخت فیلوژنتیکی، گونه‌های لاکتوباسیلوس برویس سویه ۲۰-۱۲۳ و لاکتوباسیلوس برویس سویه ۱۸۷۲ قرابت بیشتری نسبت به هم دارند و دارای جد مشترک هستند. پس از بلاست در سایت NCBI، گونه‌های مخمری جدا شده از نوع:

(C6) Kluyveromyces lactis strain CBS 683

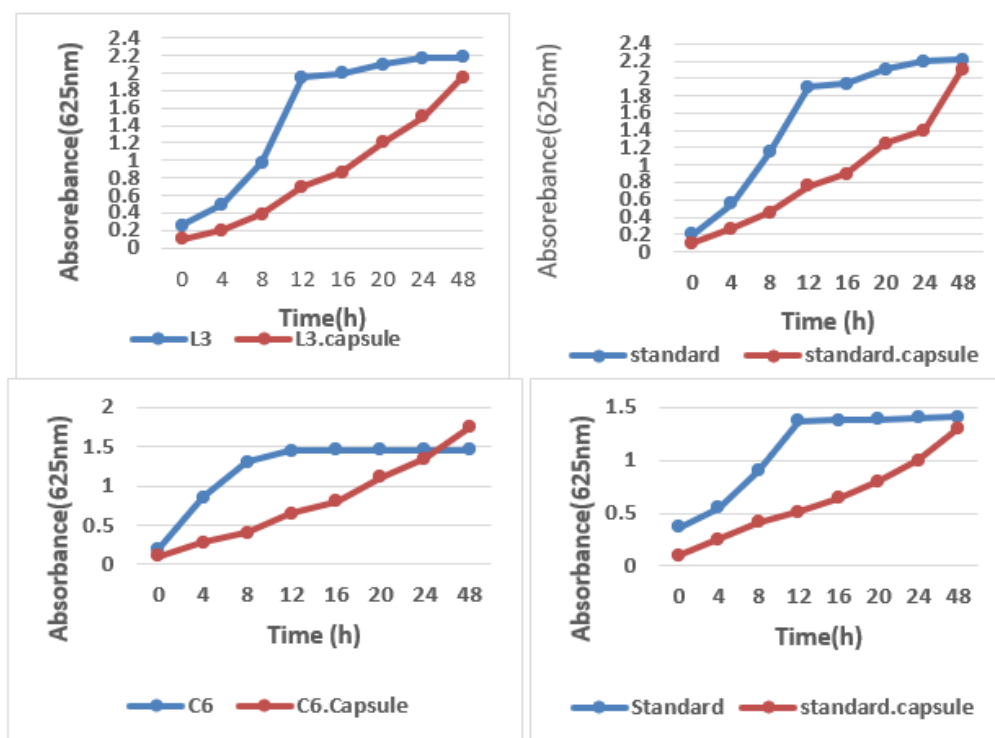
Saccharomyces cerevisiae strain
(Standard) *GITA551*

جایگاه هر دو مخمر با رسم درخت فیلوژنتیکی مقایسه شد. با توجه به درخت فیلوژنتیکی رسم شده، طول شاخه‌های داخلی با توجه به مقیاس ۰/۰۰۲ بسیار



شکل ۸. نمونه‌های ریزپوشانی باکتری (بالا) روی محیط MRS و مخمر (وسط) بر روی محیط YGC پس از گذشت ۴۸ ساعت، الف) استاندارد باکتری و مخمر، ب) نمونه باکتری L3 و نمونه مخمر C6، ت) تصویر میکروسکوپ نوری از کپسول باکتری، ث) تصویر میکروسکوپ اینورت از کپسول باکتری لاکتوباسیلوس با بزرگنمایی ۴۰×

Figure 8. Bacteria (top) on MRS medium and yeast (middle) on YGC medium after 48 hours. Invert of Lactobacillus bacteria capsule with ×40 magnification



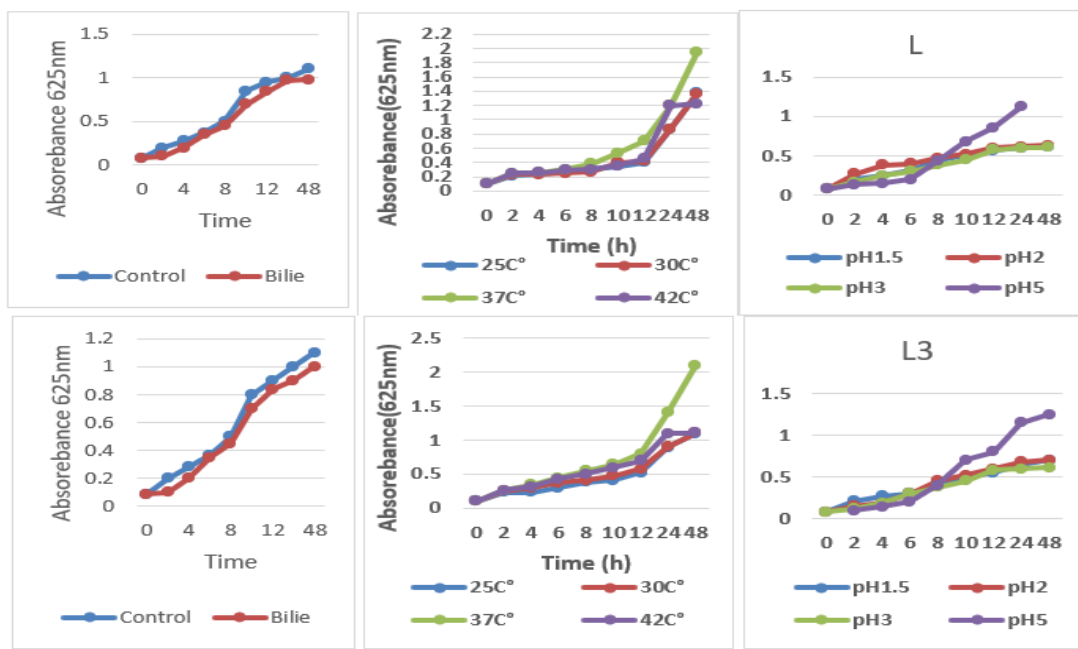
شکل ۹. بررسی نمودار میزان رشد نمونه باکتری L3k (بالا) در دمای ۳۷°C و مخمر C6k (پایین) ریزپوشانی در دمای ۳۰°C در قیاس با نمونه استاندارد

Figure 9. Examining the graph of the growth rate of bacteria sample L3k (top) at 37°C and yeast C6k (bottom) microencapsulated at 30°C in comparison with the standard sample

استاندارد تفاوت شایانی ندارد؛ اما جدایه‌ها در حالت ریزپوشانی رشد مناسب‌تری دارند.

نتایج رشد باکتری به‌دام‌افتاده در کپسول در مقایسه با نمونه استاندارد

همان‌طور که در شکل ۹ نشان داده شده است، میزان رشد جدایه‌های باکتری و مخمری نسبت به سوش



شکل ۱۰. نمودار مقاومت به اسید و حرارت و نمک صفاوی نمونه ریزپوشانی استاندارد باکتری (بالا) در قیاس با جدایه L3 (پایین)

Figure 10. Diagram of resistance to acid, heat, and bile salt of the standard microencapsulation sample of bacteria (top) in comparison with isolate L3 (bottom).

صفرا در شرایط ریزپوشانی و آزاد مقاومت نشان دادند. ریزپوشانی تأثیر معنی‌داری بر روی میزان رشد در شرایط اسیدی و دما نداشت؛ بنابراین، همان‌طور که در نمودار شکل ۱۱ دیده می‌شود، بهترین میزان رشد در اسیدیته ۵ و حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاد.

نتایج طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ قارچ لنتینولا اودوس

شکل ۱۲، نتایج طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ استخراج پلی‌ساکاریدهای قارچ لنتینولا اودوس و همچنین، پیک‌هایی در نواحی 3458 cm^{-1} ، 2084 cm^{-1} ، 1633 cm^{-1} و 695 cm^{-1} را نشان می‌دهد. پیک در ناحیه 3458 cm^{-1} نشان‌دهنده گروه‌های N-H کششی آمین‌های نوع اول است. پیک در نواحی 2084 cm^{-1}

نتایج بررسی میزان رشد جدایه‌های باکتریایی و مخمری در شرایط ریزپوشانی در شرایط استاندارد

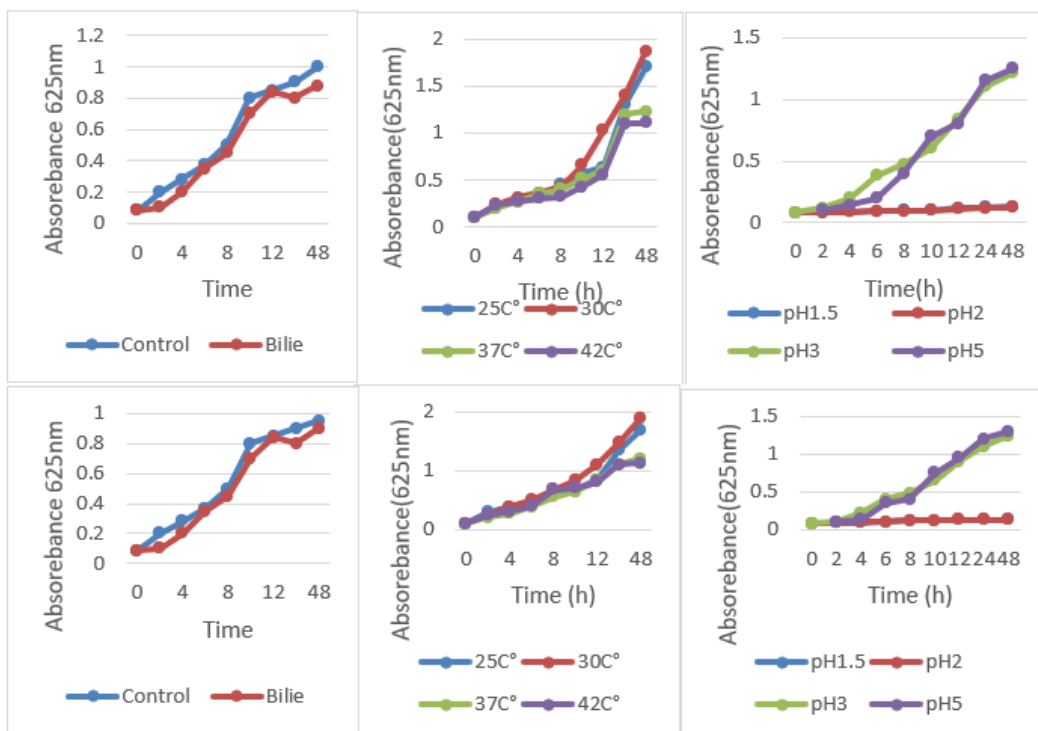
جدایه L3 ریزپوشانی در pH ۵-۳۷ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بهترین رشد را پس از ۴۸ ساعت داشت و در حضور نمک صفاوی مقاومت نشان داد. نمونه ریزپوشانی L3 در مقایسه با جدایه L3 آزاد رشد کمتری داشت؛ اما بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تست‌های پروبیوتیکی توانایی رشد خود را حفظ کرده بود که علت آن تشکیل لایه کپسول است. نتایج در شکل ۱۰ مشاهده می‌شوند.

نتایج رشد مخمر به‌دام‌افتاده در کپسول در مقایسه با نمونه استاندارد

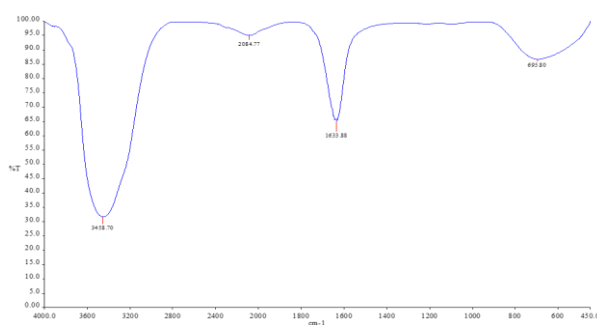
جدایه مخمری و همچنین، نمونه استاندارد نسبت به

با نمونه‌های به‌دست‌آمده از سایر تحقیقات مربوط به طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ داشت.

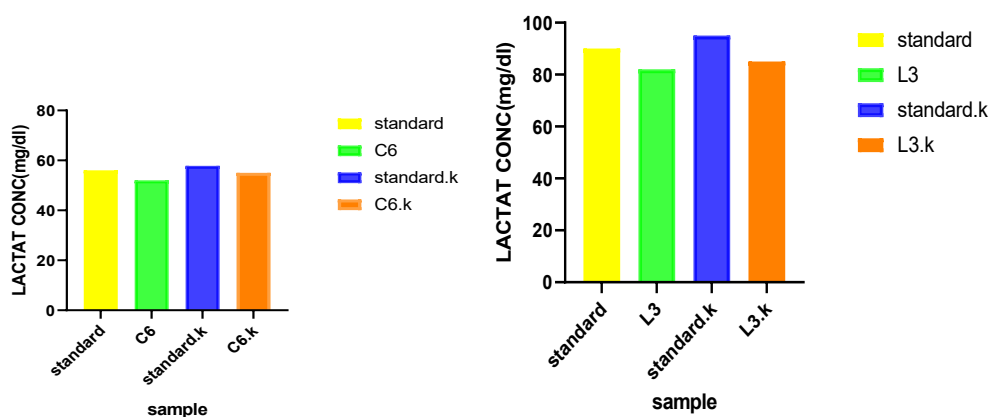
C=O کششی اسید هالید است. پیک در ناحیه cm^{-1} ۶۹۵^۱ نشان‌دهنده گروه‌های C=C است. نتایج به‌دست‌آمده نشان دادند نمونه تولیدشده مطابقت فراوانی



شکل ۱۱. مقاومت به اسید و حرارت و نمک صفرای نمونه ریزپوشانی استاندارد مخمری (بالا) در قیاس با جدایه C6k (پایین)
 Figure 11. Resistance to acid, heat and bile salt standard yeast microencapsulation sample (top) in comparison with C6k isolate (bottom)



شکل ۱۲. نتایج FTIR پلی ساکاریدهای قارچ لنتینولا ادودس
 Figure 12. FTIR results of Lentinola edodes mushroom polysaccharides



شکل ۱۳. میزان تولید اسیدلاکتیک در نمونه آزاد و ریزپوشانی باکتری و مخمر استاندارد در مقایسه با جدایه‌ها L3 و C6 با نرم‌افزار Graph pad
Figure 13. The amount of lactic acid production in the free sample of bacteria and standard yeast in comparison with isolates L3 and C6 with Graph pad software

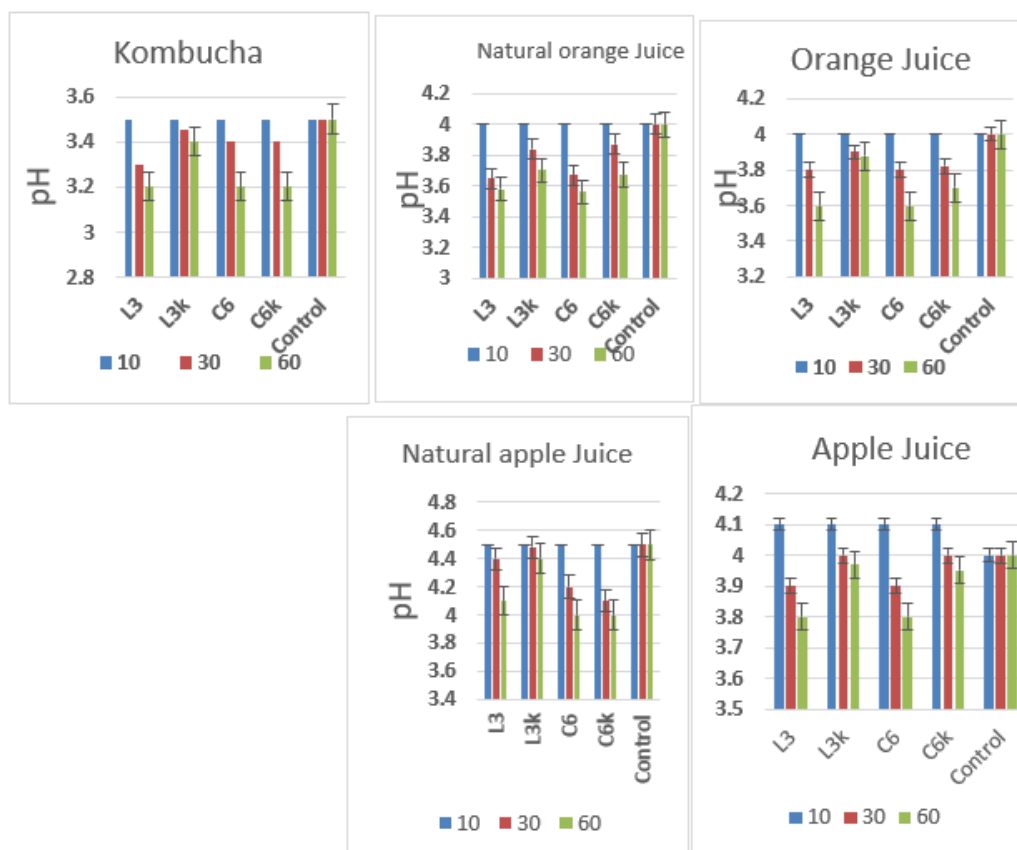
از ۴ به ۳.۶ پس از نگهداری طی ۶۰ روز و همچنین، بیشترین کاهش اسیدیته در تیمارهای ریزپوشانی مربوط به تیمار C6k که از ۴ به ۳.۷۵ پس از نگهداری طی ۶۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد است. همچنین، در آبمیوه طبیعی پرتقال، تمامی تیمارهای حاوی باکتری و مخمر آزاد و ریزپوشانی شده با گذشت زمان اسیدیته کاهش یافتند ($p < 0.05$). همچنین، نتایج مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن نشان دادند بالاترین کاهش اسیدیته در تیمار حاوی مخمر (C6) به صورت آزاد از ۴ به ۳.۵۶ پس از نگهداری طی ۶۰ روز و همچنین، بیشترین کاهش اسیدیته در تیمارهای ریزپوشانی مربوط به تیمار C6k که از ۴ به ۳.۶۷ پس از نگهداری طی ۶۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد است. در آبمیوه صنعتی سیب، تمامی تیمارهای حاوی باکتری و مخمر آزاد و ریزپوشانی شده با گذشت زمان اسیدیته کاهش یافتند ($p < 0.05$). همچنین، نتایج مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن نشان دادند بالاترین کاهش اسیدیته در تیمار حاوی باکتری (L3) و مخمر (C6) به صورت آزاد از ۴.۱ به ۳.۸ پس از نگهداری طی ۶۰ روز و همچنین، بیشترین کاهش اسیدیته در تیمارهای ریزپوشانی مربوط به تیمار C6k که از ۴.۱ به ۳.۸۵ پس از نگهداری طی ۶۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد است.

نتایج تست اسیدلاکتیک

در شکل ۱۳ L3 (تیمار حاوی باکتری پروبیوتیک آزاد لاکتوباسیلوس برویس)، L3k (تیمار حاوی باکتری پروبیوتیک ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس برویس با آلزینات سدیم، پلی‌ساکاریدهای لنتینولا / اودوس)، C6 (تیمار حاوی مخمر پروبیوتیک آزاد کلایورومایسس لاکتیس)، C6k (تیمار حاوی مخمر پروبیوتیک ریزپوشانی شده کلایورومایسس لاکتیس با آلزینات سدیم، پلی‌ساکاریدهای لنتینولا / اودوس) می‌باشند. با توجه به شکل ۱۳، میزان تولید اسید لاکتیک توسط لاکتوباسیلوس استاندارد ریزپوشانی و جدایه ریزپوشانی بیشترین تولید را داشت. مخمر ریزپوشانی نیز میزان تولید اسیدلاکتیک بیشتری داشت؛ اما اختلاف معنی‌داری در میزان تولید وجود نداشت. ریزپوشانی از تولید پست بیوتیک اسید لاکتیک ممانعت نکرده بود.

نتایج ماندگاری جدایه‌ها در آبمیوه‌ها

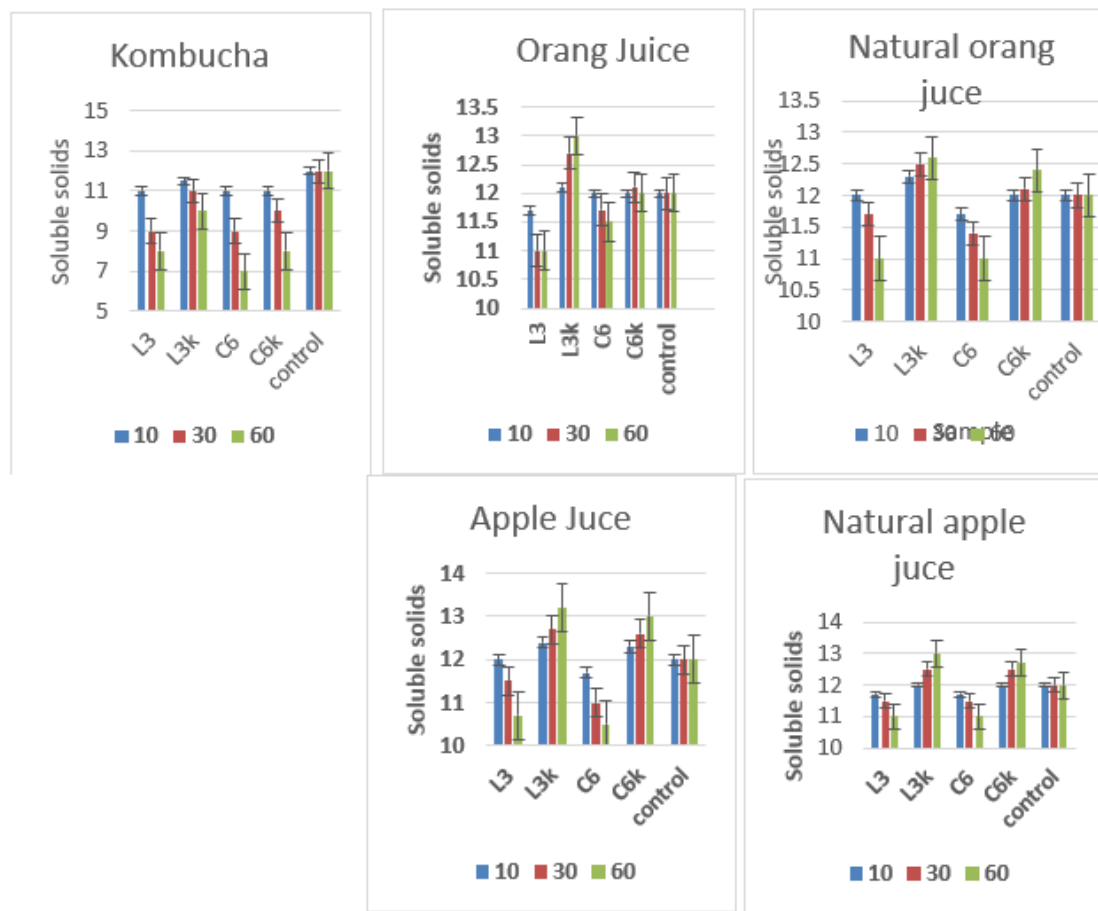
با توجه به نتایج شکل ۱۴، مشاهده شد در آبمیوه صنعتی پرتقال، تمامی تیمارهای حاوی باکتری و مخمر آزاد و ریزپوشانی شده با گذشت زمان اسیدیته کاهش یافتند ($p < 0.05$). همچنین، نتایج مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن نشان دادند بالاترین کاهش اسیدیته در تیمار حاوی باکتری (L3) و مخمر (C6) به صورت آزاد



شکل ۱۴. تغییرات pH تیمارهای مختلف در آبمیوه‌های مختلف در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد
 Figure 14. Changes in pH of different treatments in different juices during 60 days of storage at 4°C

حاوی باکتری و مخمر آزاد و ریزپوشانی شده با گذشت زمان اسیدیته کاهش یافتند ($p < 0.05$). همچنین، نتایج مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن نشان دادند بالاترین کاهش اسیدیته در تیمار حاوی باکتری (L3) و مخمر (C6) به صورت آزاد از ۳.۵ به ۳.۲ پس از نگهداری طی ۶۰ روز و همچنین، بیشترین کاهش اسیدیته در تیمارهای ریزپوشانی مربوط به تیمار C6k که از ۳.۵ به ۳.۲ پس از نگهداری طی ۶۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد است. دلیل کاهش اسیدیته در آب میوه‌ها می‌تواند ناشی از تولید اسید باشد.

در آبمیوه طبیعی سیب، تمامی تیمارهای حاوی باکتری و مخمر آزاد و ریزپوشانی شده با گذشت زمان اسیدیته کاهش یافتند ($p < 0.05$). همچنین، نتایج مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن نشان دادند بالاترین کاهش اسیدیته در تیمار حاوی مخمر (C6) به صورت آزاد از ۴.۵ به ۴ پس از نگهداری طی ۶۰ روز و همچنین، بیشترین کاهش اسیدیته در تیمارهای ریزپوشانی مربوط به تیمار C6k که از ۴.۵ به ۴ پس از نگهداری طی ۶۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد است. در نوشیدنی طبیعی کامبوچا تمامی تیمارهای



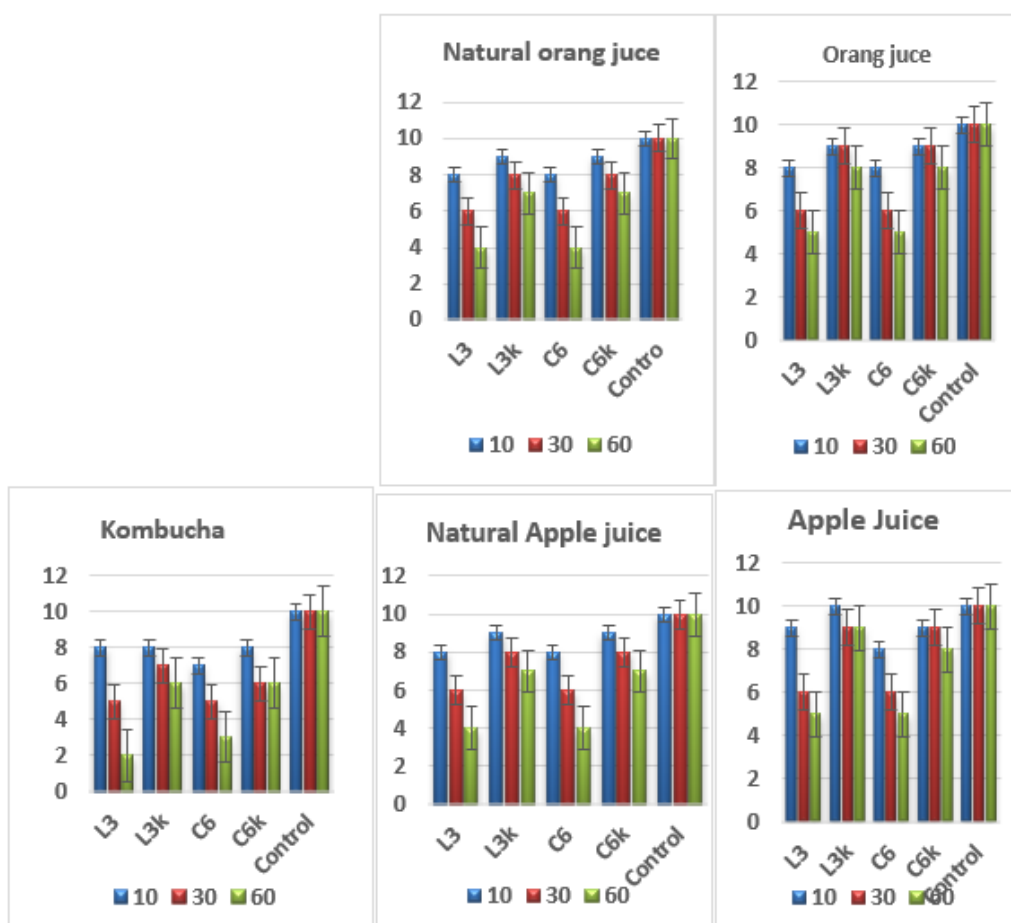
شکل ۱۵. تغییرات مواد جامد محلول تیمارهای مختلف در آبمیوه‌های مختلف در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

Figure 15. Changes in soluble solids of different treatments in different juices during 60 days of storage at 4°C

مقدار مواد جامد محلول در آبمیوه‌های صنعتی و طبیعی ریزپوشانی شده با مخمر (C6k) در پایان دوره نگهداری بریکس آبمیوه‌های صنعتی پرتقال و سیب به ترتیب ۱۲/۷، ۱۲/۴ افزایش یافت. مقدار مواد جامد محلول در نوشیدنی کامبوچا ریزپوشانی شده با باکتری (L3k) و مخمر (C6k) در پایان دوره نگهداری بریکس کاهش معنی‌داری داشت. علت افزایش مقدار مواد جامد محلول در نوشیدنی می‌تواند وجود ترکیبات قندی در این پروبیوتیک باشد.

نتایج تغییرات مواد جامد محلول

با توجه به شکل ۱۵ نتایج تجزیه تحلیل آماری داده‌ها نشان دادند اثر تیمار و زمان و اثر متقابل تیمار و زمان بر میزان مواد جامد محلول معنی‌دار بودند ($p < 0.05$) در مقایسه، تیمارهای ریزپوشانی شده نسبت به تیمارهای آزاد افزایش معنی‌داری داشتند. مقدار مواد جامد محلول در آبمیوه‌های صنعتی و طبیعی ریزپوشانی شده با باکتری (L3k) در پایان دوره نگهداری بریکس آبمیوه‌های صنعتی پرتقال و سیب به ترتیب ۱۳، ۱۲/۶ افزایش یافت.



شکل ۱۶. ارزیابی حسی عطر تیمار آبمیوه‌های طبیعی و صنعتی در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

Figure 16. Sensory evaluation of the aroma treatment of natural and industrial juices during 60 days of storage at 4 degrees Celsius

سانتی‌گراد انجام شد. نتایج تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان دادند اثر زمان در تیمارهای L3k و C6k بر امتیاز طعم معنی‌دار بود. بالاترین امتیاز طعم بعد از نمونه کنترل مربوط L3k و C6k آبمیوه صنعتی پرتقال در روز ۱۰ بود. کمترین امتیاز طعم مربوط به تیمار C6 نوشیدنی کامبوچا در روز ۶۰ است. نتایج در شکل ۱۷ نشان داده شده‌اند.

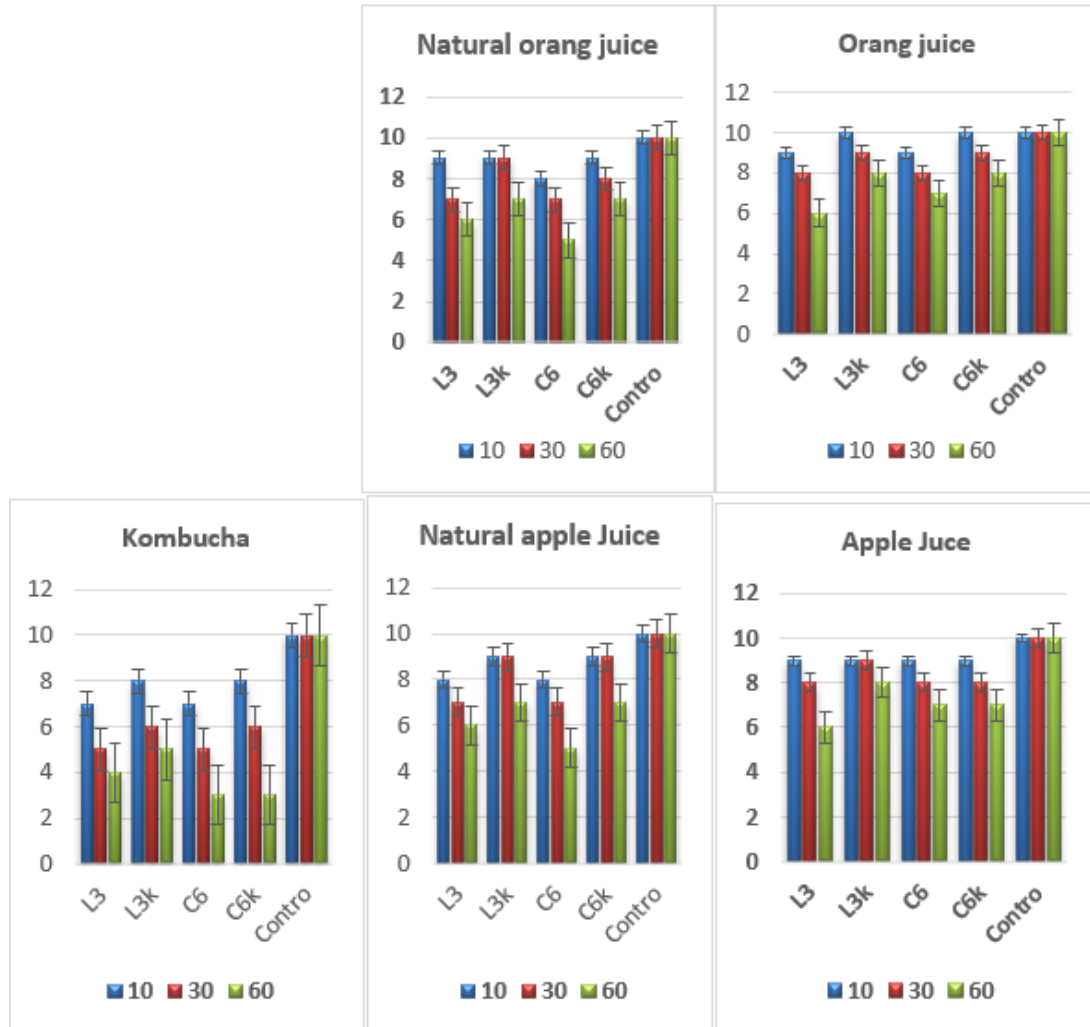
ارزیابی حسی بافت در تیمارهای آبمیوه صنعتی و طبیعی پروبیوتیک در مدت ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نتایج تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان دادند اثر زمان در تیمارهای L3k و C6k بر امتیاز طعم معنی‌دار بود. بالاترین امتیاز طعم بعد

نتایج ارزیابی حسی عطر، طعم و بافت

ارزیابی حسی عطر در تیمارهای مختلف آبمیوه‌های صنعتی و طبیعی پروبیوتیک در مدت ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نتایج تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان دادند اثر زمان در تیمارهای L3k و C6k بر امتیاز عطر معنی‌دار بود. بالاترین امتیاز عطر بعد از نمونه کنترل مربوط به تیمار L3k + آبمیوه صنعتی سیب در روز ۱۰ بود. کمترین امتیاز عطر مربوط به تیمار L3 در روز ۶۰ نوشیدنی کامبوچا است. نتایج در شکل ۱۶ نشان داده شده‌اند.

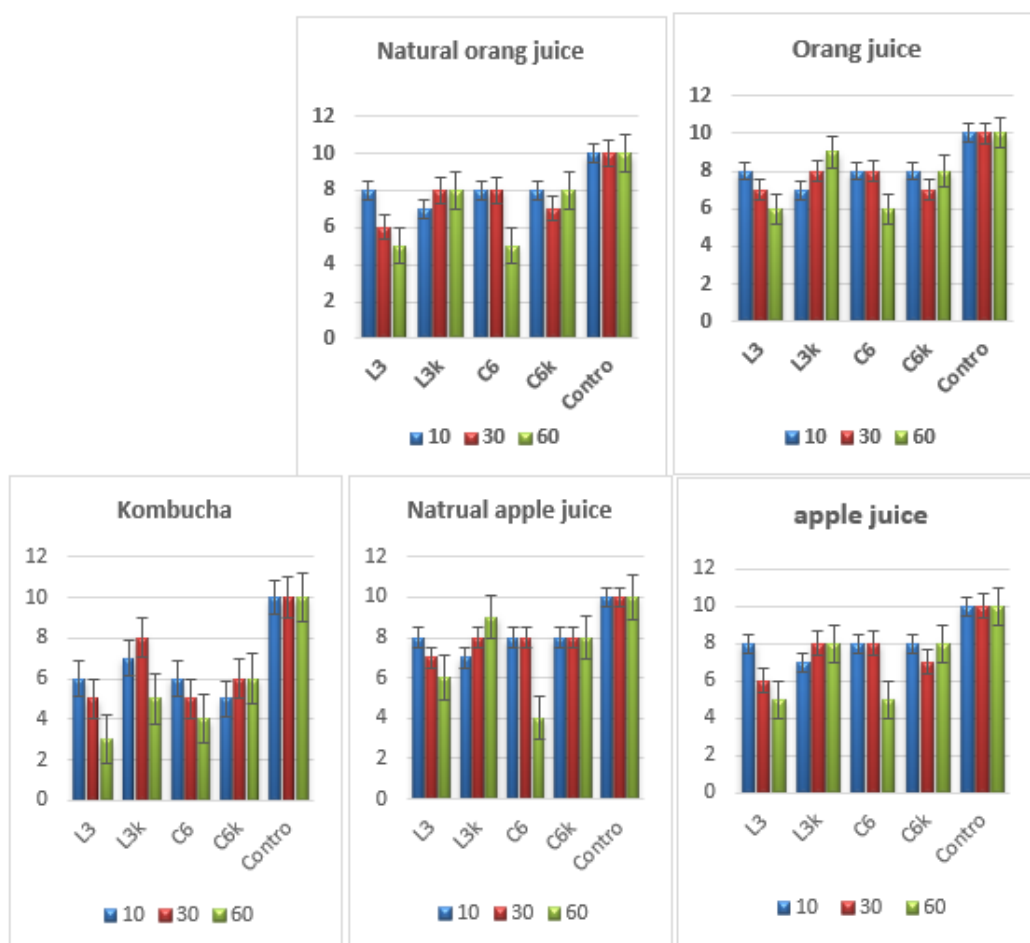
ارزیابی حسی طعم در تیمارهای آبمیوه صنعتی و طبیعی پروبیوتیک در مدت ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه

از نمونه کنترل مربوط L3k آبمیوه صنعتی پرتقال در ۶۰ روز ۶۰ است. نتایج در شکل ۱۸ نشان داده شده‌اند.



شکل ۱۷. ارزیابی حسی طعم تیمار آبمیوه صنعتی پرتقال در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد

Figure 17. Sensory evaluation of the taste of industrial orange juice treatment during 60 days of storage at 4 degrees Celsius

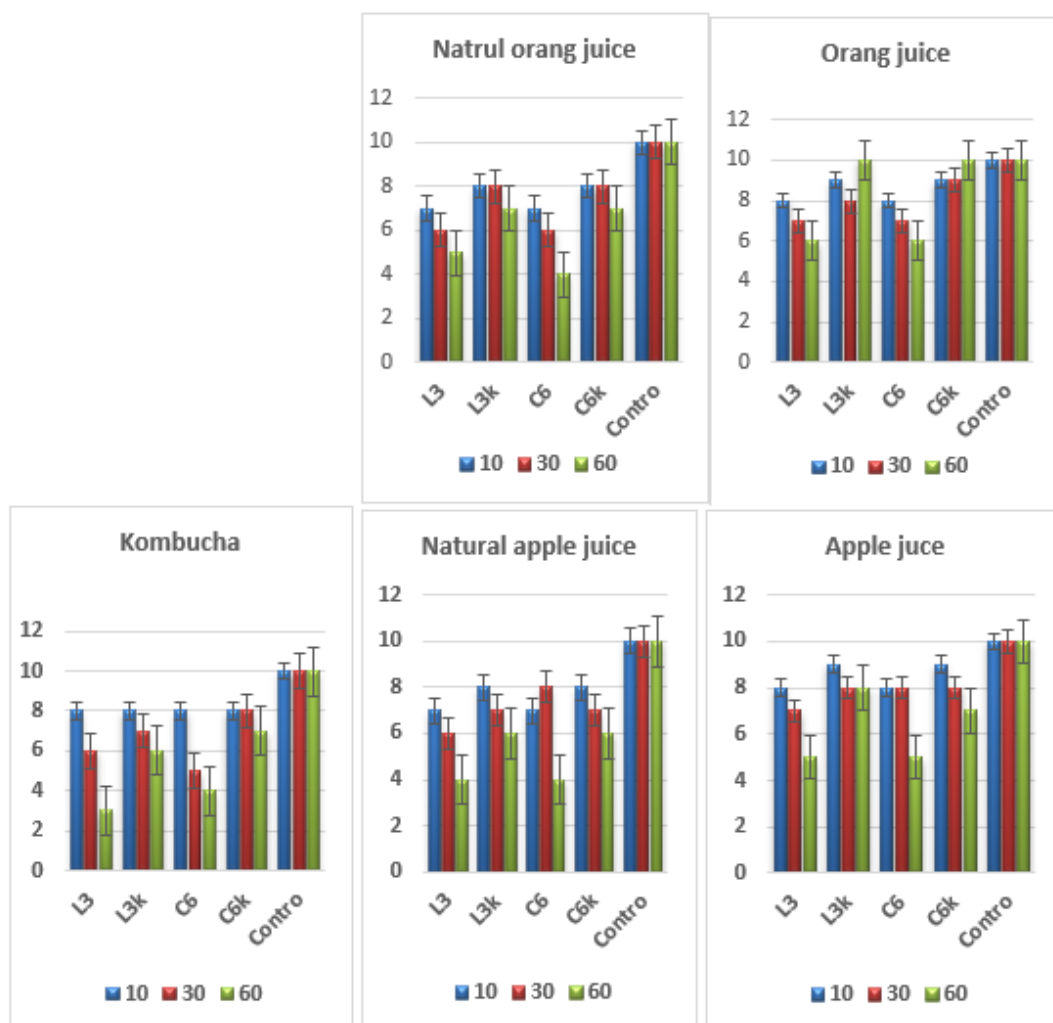


شکل ۱۸. ارزیابی حسی بافت تیمار آبمیوه صنعتی و طبیعی در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

Figure 18. Sensory evaluation of industrial and natural juice treatment texture during 60 days of storage at 4 degrees Celsius

آبمیوه‌های صنعتی، طبیعی و نوشیدنی، کامبوچا از کمترین مقبولیت برخوردار بود که به دلیل افزایش اسیدیته در اثر فعالیت باکتری و طعم ترش آن است. برای هر دو باکتری و مخمر، تیمارهای حاوی پروبیوتیک‌های ریزپوشینه از مقبولیت نسبی کمتری برخوردار بودند. علت این امر نیز مربوط به احساس زبانی ریزپوشینه‌ها در موقع مصرف آبمیوه است. نتایج در شکل ۱۹ دیده می‌شوند.

ارزیابی حسی رنگ در تیمارهای آبمیوه صنعتی و طبیعی پروبیوتیک در مدت ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نتایج تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان دادند اثر زمان در تیمارهای L3k و C6k بر امتیاز طعم معنی‌دار بود. بالاترین امتیاز رنگ بعد از نمونه کنترل مربوط L3k و C6k آبمیوه صنعتی پرتقال در روز ۶۰ بود. کمترین امتیاز طعم مربوط به تیمار L3 نوشیدنی کامبوچا در روز ۶۰ بود. در میان تمامی نمونه‌های تیمار حاوی L3 و C6 آزاد در



شکل ۱۹. ارزیابی حسی رنگ تیمار آبمیوه صنعتی و طبیعی در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

Figure 19. Color sensory evaluation of industrial and natural fruit juice treatment during 60 days of storage at 4 degrees Celsius

مواد هسته‌ای (انکپسولانت)، مواد تشکیل‌دهنده دیواره مواد ریزپوشانی‌کننده و تکنولوژی‌های مرتبط وجود دارد که امکان تولید ریزکپسول‌هایی با اندازه‌ها و اشکال و خصوصیات مورفولوژیکی مختلف را امکان پذیر می‌کند (۶). از طرفی، پروبیوتیک‌ها اثرات مفیدی بر میزبان دارند و متابولیت‌های پروبیوتیک مانند اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه و اسید لاکتیک نیز نقش مهمی در سلامتی مصرف‌کننده ایفا می‌کنند. قارچ *لنتینولا/دودس* حاوی ترکیباتی است که به‌عنوان مکمل غذایی - دارویی مطرح است و ترکیبات پلی‌ساکاریدی آن به‌عنوان کپسول می‌توانند نقش نگهدارنده

بحث و نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد یافتن میکروارگانیسم مناسب از منابع لبنی، مهندسی ژنتیک و پوشش‌دهی آنها می‌تواند راهکار مناسبی برای ارائه پروبیوتیک‌ها به صنعت غذا باشد (۴). مقاله حاضر، با مروری بر مکانیسم اثر پروبیوتیک و کاربردهای آن، به پیشرفت‌های اخیر در بهبود کارایی این میکروارگانیسم‌ها می‌پردازد. ریزپوشانی می‌تواند خصوصیات حسی محصولات غذایی و همچنین، تعداد و عملکرد پروبیوتیک‌ها را حفظ کند. در زیست‌فناوری غذایی، دامنه وسیعی از

باکتری‌های اسیدلاکتیک باشد و همچنین، به‌عنوان یک نوشیدنی پروبیوتیک از خانواده سبزیجات مورد توجه قرار گیرد (۳۰).

مقاومت جدایه‌ها به نمک‌های صفراوی بررسی شد. در دستگاه گوارشی انسان، میانگین غلظت نمک‌های صفراوی ۳/۰ درصد وزنی حجمی است و برای غربال سویه‌های مقاوم به صفرا بحرانی و کافی تلقی می‌شود. در این پژوهش، این غلظت برای ارزیابی قابلیت رشد ۴ سویه انتخاب‌شده در حضور نمک‌های صفراوی انتخاب شد. رشد کمتر سویه‌ها با نمک‌های صفراوی در نتایج براساس پیشنهاد ارائه‌شده توسط Chateau و همکاران (۱۹۹۴) و Guo و همکاران (۲۰۰۹) که گروه‌های متمایز را براساس تأخیر رشد و عدم رشد ایجادشده به‌وسیله نمک‌های صفراوی تشخیص داده بودند، تحلیل شد (۳۱). جدایه‌های مطالعه حاضر در حضور نمک‌های صفراوی رشد کمتری داشتند. یافته‌های در آزمایش جدایه‌های انتخاب‌شده نسبت به نمک‌های صفراوی با یافته‌های موجود در مطالعات قبلی مطابقت داشتند. در خصوص سویه‌های آزمایش‌شده، رشد کمتر جدایه‌ها با نمک‌های صفراوی نسبت به کشت کنترل مشهود بود. تعیین تحمل به اسیدیته برای ۲ سویه، با اسیدیته‌های مختلف در ساعت‌های مختلف انجام شد که نتایج گزارش شده‌اند. براساس درصد بقاء، جدایه‌ها مقاومت خوبی داشتند. تحقیقات مشابه انجام‌شده توسط Conway و همکاران نشان داد تحمل محیط اسیدی معده از ویژگی‌های میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک است و برای اثبات پروبیوتیک‌بودن سویه‌ها، مقاومت بالا در برابر نمک‌های صفراوی و حرارت، توانایی اتصال به سلول‌های مخاط روده می‌تواند از مهم‌ترین خصوصیات پروبیوتیکی یک سویه باشد. در این مطالعه، بعد از یافتن شرایط بهینه ذکرشده در بالا، اسیدیته محیط معادل ۵/۵ و دما معادل ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد و محیط

خصوصیات باکتری پروبیوتیک را داشته باشند و همچنین، به‌عنوان پری‌بیوتیک به بهبود عملکرد پروبیوتیک کمک شایانی کنند (۱۷). محققان از حلال‌هایی مانند کلروفورم و اتیل استات برای استخراج ترکیبات آنتی‌بیوتیکی از قارچ خشک‌شده شیتاکه علیه باکتری‌ها استفاده کرده‌اند (۱۴).

در این تحقیق، ۲۰ نمونه مختلف از پساب کارخانجات لبنیات براساس فرمول کوکران از مناطق مختلف تهران جداسازی شدند که تعداد دو جدایه (۱) جدایه مخمر و ۱ جدایه باکتری) از بین ۱۰ با توان نسبی پروبیوتیکی جدا شدند.

M. Arevalo و همکاران در سال ۲۰۱۷ در تحقیقی با توجه به اینکه باکتری‌ها تنها میکروب‌های پروبیوتیک نیستند به بررسی خواص پروبیوتیکی مخمرها و چگونگی استفاده از آنها در محصولات غذایی پرداختند (۲۷). در تحقیق حاضر نیز هم راستا با تحقیق ذکرشده به جداسازی مخمر ساکارومایسس و کلائیورومایسس لاکتیس پرداخته شد. عدالتیان و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای نشان دادند محیط MRS آگار برای باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس مناسب است و این جنس در این محیط غالب است (۲۸). تعیین تحمل به اسیدیته برای ۲ سویه، با اسیدیته‌های مختلف در ساعت‌های مختلف انجام شد که نتایج گزارش شده‌اند. براساس درصد بقاء، جدایه‌ها مقاومت خوبی را دارا بودند. تحقیقات مشابه انجام‌شده برای انتخاب جدایه‌های مقاوم به اسید با استفاده از محتوی معده گزارش شده‌اند (۲۹). یانگ یونگ و همکاران (۲۰۰۴) آب گوجه‌فرنگی پروبیوتیک توسط لاکتیک اسید باکتری‌ها تولید کردند. باکتری‌های پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس‌ها بودند که به آب گوجه‌فرنگی پاستوریزه اضافه شدند و تخمیر انجام شد. آب گوجه‌فرنگی می‌تواند یک ماده خام مفید برای تخمیر

اضافه کردن پروبیوتیک به نوشیدنی ها به مراتب پیچیده تر از لبنیات است و این امر به دلیل محیط اسیدی شربت هاست که از محدوده تحمل پذیر این باکتری ها پایین تر است. فناوری ریزپوشانی می تواند تا حد زیادی در حل این مشکل موثر باشد که به طور موفقیت آمیزی در قالب شبکه ها و کپسول های مختلف در محافظت از سلول های باکتری از آثار مخرب محیط نوشیدنی به کار برده شده است. ریزپوشانی به وسیله پوشش اطراف باکتری های پروبیوتیک، آنها را از محیط نوشیدنی جدا نگه می دارد (۳۳). در این مطالعه، تغییرات مقدار مواد جامد محلول محاسبه شده در آبمیوه های صنعتی و طبیعی پروبیوتیک در مدت ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. بر طبق نتایج آماری اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار و زمان بر میزان مواد جامد محلول معنی دار بود ($p < 0/05$). در مقایسه، تیمارهای ریزپوشانی شده نسبت به تیمارهای آزاد افزایش معنی داری داشتند. مقدار مواد جامد محلول در آبمیوه های صنعتی و طبیعی ریزپوشانی شده با باکتری (L3k) در پایان دوره نگهداری بریکس آبمیوه های صنعتی پرتقال و سیب به ترتیب ۱۲/۶، ۱۳ افزایش یافت. مقدار مواد جامد محلول در آبمیوه های صنعتی و طبیعی ریزپوشانی شده با مخمر (C6k) در پایان دوره نگهداری بریکس آبمیوه های صنعتی پرتقال و سیب به ترتیب ۱۲/۴، ۱۲/۷ افزایش یافت. مقدار مواد جامد محلول در نوشیدنی کامبوچا ریزپوشانی شده با باکتری (L3k) و مخمر (C6k) در پایان دوره نگهداری بریکس کاهش معنی داری داشت. علت افزایش مقدار مواد جامد محلول در نوشیدنی می تواند وجود ترکیبات قندی در این پروبیوتیک باشد. دینگ و شاه (۲۰۰۸) گزارش کردند بریکس نهایی آب پرتقال و آب سیب حاوی لاکتوباسیلوس آسیدوفیلوس ریزپوشانی شده در پایان ۴۹ روز نگهداری بالاتر از آبمیوه های حاوی همین باکتری در حالت آزاد بود. تایتان و همکاران (۲۰۱۵) نیز

کشت پتیتودکستروز آگار و پتیتودکستروز برات برای آزمایشات بعدی، تهیه و بانک کشت میسلیم قارچ *لنتینولا/دودس* تهیه شد و سپس استخراج پلی ساکارید با استفاده از روش استخراج آب گرم و رسوب گیری با اتانول از انجام شد. سپس خالص سازی با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی انجام شد. در مطالعه ای مشابه، Lee HH و همکاران با استفاده از روش استخراج آب گرم و رسوب به وسیله اتانول از میسلیم و جسم بارده خارج *لنتینولا/دودس* استخراج پلی ساکارید را انجام دادند که نتایج حاکی بر مقدار بیشتر این پلی ساکارید در میسلیم این قارچ بودند که با نتایج به دست آمده از تحقیقات در این مطالعه مطابقت دارند (۳۲). محمودی در سال ۱۳۹۶ در مطالعه ای، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی - پروبیوتیکی را نشان داد. او بیان کرد حدود ۵۱ درصد باکتری ها به آنتی بیوتیک کوتریموکسازول مقاوم بودند. موثرترین آنتی بیوتیک، سیروفلوکساسین با حساسیت ۸۲ درصد بود. لاکتوباسیل ها به غلظت بالای ونکومايسين مقاوم هستند.

در این مطالعه، سویه های لاکتوباسیل مقاوم به استریتومايسين ونکومايسين و نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین، کلیندامایسین و کلرامفنیکل حساس و نسبت به آنتی بیوتیک جنتامایسین نیمه حساس بودند. سویه های مخمر به فلوکونازول، کتوکونازول و نیستاتین حساس اند و به ایتراکونازول مقاوم هستند. سویه های لاکتوباسیل ریزپوشانی مقاوم به استریتومايسين، ونکومايسين، تتراسایکلین، کلیندامایسین بودند. سویه های ریزپوشانی کلایورومايسين به فلوکونازول و نیستاتین مقاوم اند و به کتوکونازول و آمفوتریسین B حساس هستند. علت مقاومت آنتی بیوتیک های باکتری ریزپوشانی شده می تواند ناشی از لایه ریزپوشانی باشد که دور باکتری را گرفته است و باعث عدم تشکیل هاله می شود.

در آب سیب حاوی باکتری پلاتاروم گزارش کردند که مقدار مواد جامد محلول در طول ۲۸ روز نگهداری از بریکس ۱۲/۷۹ به ۱۲/۰۴ کاهش یافت که با نتایج این بررسی مطابقت داشت.

نتایج مشابهی در آب هویج با باکتری‌های پروبیوتیک آزاد و ریزپوشانی‌شده توسط نازارو و همکاران (۲۰۰۹) گزارش شده‌اند. در تحقیق دیگر توسط گندمی و همکاران (۲۰۱۶) گزارش شد که کاهش اسیدیت در آب سیب با باکتری آزاد لاکتوباسیلوس رامنوس GG بیشتر از باکتری ریزپوشانی‌شده با آلزینات کیتوزان و اینولین بود. نتایج این تحقیق با نتایج پژوهش دیمیتروفسکی و همکاران (۲۰۱۵) که منجر به «تولید نوشیدنی غیرلبنی حاوی پروبیوتیک» شده بود، همخوانی دارد (۳۴). در این تحقیق، از لاکتوباسیلوس پلاتاروم به صورت ریزپوشانی در آب سیب استفاده شد. این باکتری به دو صورت بدون کپسول و دارای کپسول با آلزینات و در مقادیر مختلف اسیدیت تهیه شد. در طول مدت تخمیر، میزان قند، اسیدیت سنتیک رشد، تولید لاکتیک اسید و میزان زنده‌مانی در مدت نگهداری اندازه‌گیری شدند و بهترین نتایج در محدوده اسیدیت ۴/۲ به دست آمد و حداکثر تراکم سلولی به $2/5 \times 10^9$ CFU/mL رسید. همچنین، طبق نتایج به دست آمده، قابلیت زنده‌مانی باکتری‌ها در دمای ۴-۷ درجه سانتی‌گراد به کمک فرآیند ریزپوشانی بهبود یافته است. نتایج مطالعه حاضر نشان دادند ماندگاری ویژگی‌های حسی آبمیوه پرتقال، سیب نوشیدنی کامبوچا با استفاده از باکتری، آلزینات سدیم و پلی‌ساکارید و مخمر ریزپوشانی‌شده نسبت به باکتری و مخمر آزاد بعد از گذشت ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد حفظ شد و زنده‌مانی باکتری به صورت مطلوبی افزایش داشت و مشخص شد بهترین عملکرد را در محافظت از باکتری‌ها در کپسول با ترکیب باکتری لاکتوباسیلوس برویس سویه ۲۰-۱۲۳ آلزینات سدیم و پلی‌ساکارید‌های لنتینولا/دودس در آبمیوه پرتقال و سیب داشت. مقدار

اسیدیت از مسائل مهم در تولید یک فرآورده پروبیوتیکی است؛ زیرا اسیدیت در مدت زمان نگهداری محصول کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده رشد پروبیوتیک است. تغییرات سایر فاکتورهای اندازه‌گیری‌شده از قبیل کاهش بریکس و افزایش اسیدیت تأییدکننده تکثیر و فعالیت پروبیوتیک با محتوای قندی بالا را به اثبات رسانده‌اند. در این تحقیق مشخص شد که فرآیند ریزپوشانی باکتری و مخمر پروبیوتیک می‌تواند از جمله راهکارهای افزایش زنده‌مانی این باکتری‌ها در محصولات غذایی باشد. از طرفی، آلزینات مستخرج از جلبک و پلی‌ساکارید قارچ کلاه‌دار خوراکی - دارویی که از منابع مهم بیولوژیک هستند، می‌توانند انتخاب مناسبی برای این فرآیند باشند. با توجه به اینکه هر دو پلی‌ساکارید سمی نیستند، زیست‌سازگار، در دسترس و بومی هستند و می‌توانند یک پوشش مناسب در اطراف میکروب مدنظر ایجاد کنند که روی ساختار میکروب تأثیر بد نداشته باشد و عملکرد میکروب‌ها را حفظ و تقویت کند. همچنین، پلی‌ساکارید قارچ می‌تواند خواص پری‌بیوتیکی داشته باشد و دیدگاه این تحقیق را محقق کند که ارائه یک محصول دو جانبه است. روش ریزپوشانی برای حفظ خصوصیات عملکردی میکروب پروبیوتیک بسیار مؤثر است. همچنین نقش پری‌بیوتیکی پلی‌ساکارید بسیار حائز اهمیت است که پس از مصرف آن توسط انسان باعث عملکرد بهینه میکروارگانیسم‌ها و تولید پست‌بیوتیک‌ها و ارتقای سلامت انسان می‌شود. با انجام تحقیقات بیشتر، می‌توان نوشیدنی‌های فراویژه و سودمند را تولید کرد که حاوی ترکیبات سودمند مانند مواد معدنی، ترکیبات آنتی‌اکسیدان، فیبرهای رژیمی و ویتامین‌ها باشد و به ارتقای سلامت انسان کمک کند.

تشکر

نویسندگان از کادر آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال تشکر می‌کنند. در این مطالعه هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

References

- (1) Azizi Shafa M, Akhondzadeh Basti A, Sharifan A, Khanjari A. Reformulation of traditional Iranian food (Doeneh) using probiotics: Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12, Lactobacillus acidophilus LA-5, Lacticaseibacillus rhamnosus LGG, and inulin and its effect on diabetic and non-diabetic rats. *Food Quality and Safety*, 2023; fyad028.
<https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyad028>
- (2) Mazziotta C, Tognon M, Martini F, Torreggiani E, Rotondo JC. Probiotics mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health. *Cells*, 2023; 12(1): 184.
<https://doi.org/10.3390/cells12010184>
- (3) Bonyadi F, Tukmechi A, Mohebalian H. An overview of probiotics and their role in cancer management. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 2014; 24(112): 128-40.
<http://jmums.mazums.ac.ir/article-1-3122-en.html> [In Persian].
- (4) Mohkam M, Afifi N, Zamir AR, Heidari R, Zamani MR, Nezafat N, et al. Investigation of lipase inhibitory activity of novel probiotics isolated from Iranian dairy products. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2023; 12(6): e9357-e.
<https://doi.org/10.55251/jmbfs.9357>
- (5) Amin T, Thakur M, Jain S. Microencapsulation-the future of probiotic cultures. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2013; 3(1): 35-43.
<https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/7073>
- (6) Hosseini S, Mohammadian T, Abbaspour M, Alishahi M, Amini K. The effect of microencapsulation with alginate/chitosan on survival of probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum*) in the simulated condition of stomach and intestines in *Huso huso*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 2018 Jun 22; 27(2): 161-72.
<https://doi.org/10.22092/isfj.2018.116798> [In Persian].
- (7) Yan J, Ruan L, Hu D, Liu W, Chen W, Ma W. Microencapsulation of phase change materials with a soy oil-based polyurethane shell via pickering emulsion polymerization. *ACS Applied Energy Materials*, 2023; 6(12): 6814-6825.
<https://doi.org/10.1021/acsaem.3c01036>
- (8) Homayouni Rad, Javadi M, Ghasemnezhad Tabrizian V, Alizadeh M. A survey to increasing the probiotic survival in functional ice cream by microencapsulation. *JOURNAL OF FOOD RESEARCH*, 2012; 22(1): 97.
<https://www.sid.ir/paper/148641/en> [In Persian].
- (9) Zhou R, Xu Y, Dong D, Hu J, Zhang L, Liu H. The effects of microcapsules with different protein matrixes on the viability of probiotics during spray drying, gastrointestinal digestion, thermal treatment, and storage. *eFood* 2023; 4(4): e98 .
<https://doi.org/10.1002/efd2.98>
- (10) Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2007; 5(1): 1-18.
<https://www.sid.ir/paper/541135/en>
- (11) Vera-Santander VE, Hernández-Figueroa RH, Jiménez-Munguía MT, Mani-López E, López-Malo A. Health benefits of consuming foods with bacterial probiotics, postbiotics, and their metabolites: a review. *Molecules*, 2023; 28(3): 1230.
<https://doi.org/10.3390/molecules28031230>
- (12) Kullar R, Goldstein EJ, Johnson S, McFarland LV. *Lactobacillus bacteremia* and probiotics: A review. *Microorganisms*, 2023; 11(4): 896.
<https://doi.org/10.3390/microorganism11040896>

- (13) Saeed A, Yasmin A, Baig M, Khan K, Heyat MBB, Akhtar F, et al. Isolation and Characterization of *Lactobacillus crispatus*, *Lactococcus lactis*, and *Carnobacterium divergens* as Potential Probiotic Bacteria from Fermented Black and Green Olives (*Olea europaea*): An Exploratory Study. *BioMed Research International*, 2023; 2023(1): 8726320.
<https://doi.org/10.1155/2023/8726320>
- (14) Ghiasi F, Hashemi SMB, Abedi E. Effective enhancement of food oxidative stability induced by *Lactobacillus* strains: In vitro activity. *Food Control*, 2023; 153:109912.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109912>
- (15) De Cianni R, Pippinato L, Mancuso T. A systematic review on drivers influencing consumption of edible mushrooms and innovative mushroom-containing products. *Appetite*, 2023; 182: 106454.
<https://doi.org/10.1016/j.appet.2023.106454>
- (16) Kidd PM. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternative Medicine Review*, 2000; 5(1): 4-27.
<https://B2n.ir/p10406>
- (17) Roszczyk A, Turło J, Zagożdżon R, Kaleta B. Immunomodulatory properties of polysaccharides from *Lentinula edodes*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022; 23(16): 8980.
<https://doi.org/10.3390/ijms23168980>
- (18) Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Watari A, Kobayashi M, et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl4-induced liver injury. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2010; 33(6): 983-7.
<https://doi.org/10.1248/bpb.33.983>
- (19) White RWd, Hackman RM, Soares SE, Beckett LA, Sun B. Effects of a mushroom mycelium extract on the treatment of prostate cancer. *Urology*, 2002; 60(4): 640-4.
[https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(02\)01856-3](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(02)01856-3)
- (20) Zhang Y, Li Q, Shu Y, Wang H, Zheng Z, Wang J, et al. Induction of apoptosis in S180 tumour bearing mice by polysaccharide from *Lentinula edodes* via mitochondria apoptotic pathway. *Journal of Functional Foods*, 2015; 15: 151-9
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.025>
- (21) Jafari M, Boskabaday MH, Rezaee SA, Rezaeian S, Behrouz S, Ramezannejad R, et al. Lentinan and β -glucan extract from shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, alleviate acute LPS-induced hematological changes in mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2023; 26(7): 836.
<https://doi.org/10.22038/IJBMS.2023.67669.14820>
- (22) Hadi Chegeni A, Hadi F, Kowsari M, Zare M, Gholami Mohammadi A. Antifungal activity of native bacteria isolated from Khorramabad agricultural soil. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 2019; 26(3): 383-91.
https://jsums.medsab.ac.ir/article_1200_en.html?lang=en [In Persian].
- (23) Lotfi M. Isolation, identification and optimization of alkaline protease production by *Candida viswanathii*. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 2014; 7(4): 36-42.
<https://ijmm.ir/article-1-237-en.html&sw=Candida+Viswanathii> [In Persian].
- (24) Cook A, Stall R. *Necrosis in leaves induced by volatile materials produced in vitro by bacteria*. 1969.
<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19691102130>
- (25) Ren G, Xu L, Lu T, Yin J. Structural characterization and antiviral activity

- of lentinan from *Lentinus edodes* mycelia against infectious hematopoietic necrosis virus. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018; 115: 1202-10.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.132>
- (26) Nielsen SS. Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates. *Food analysis laboratory manual* 2010: 47-53. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_6
- (27) Arevalo-Villena M, Briones-Perez A, Corbo M, Sinigaglia M, Bevilacqua A. Biotechnological application of yeasts in food science: starter cultures, probiotics and enzyme production. *Journal of Applied Microbiology*, 2017; 123(6): 1360-72.
<https://doi.org/10.1111/jam.13548>
- (28) Edalatian MR, Habibi Najafi MB, Mortazavi SA, Alegría Á, Delgado S, Bassami MR, et al. Production of bacteriocins by *Enterococcus* spp. isolated from traditional, Iranian, raw milk cheeses, and detection of their encoding genes. *European Food Research and Technology* 2012; 234: 789-96.
<https://doi.org/10.1007/s00217-012-1697-8>
- (29) Conway P, Gorbach S, Goldin B. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 1987; 70(1): 1-12.
<https://doi.org/10.1007/s00217-012-1697-8>
- (30) Cui HaiHong CH, Chen CunLong CC, Wang JiDe WJ, Yang YuJie YY, Cun Yong CY, Wu JinBao WJ, et al. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology*, 2004 May 5; 10(10): 1521.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i10.1521>
- (31) Chateau N, Deschamps A, Sassi AH. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Letters in Applied Microbiology*, 1994; 18 (1): 42-4.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1994.tb00796.x>
- (32) Lee H-H, Lee J-S, Cho J-Y, Kim Y-E, Hong E-K. Structural characteristics of immunostimulating polysaccharides from *Lentinus edodes*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009; 19(5): 455-61.
<https://doi.org/10.4014/jmb.0809.542>
- (33) Del Piano M, Morelli L, Strozzi G, Allesina S, Barba M, Deidda F, et al. Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, 2006; 38: S248-S55.
[https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(07\)60004-8](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(07)60004-8)
- (34) Dimitrovski D, Velickova E, Langerholc T, Winkelhausen E. Apple juice as a medium for fermentation by the probiotic *Lactobacillus plantarum* PCS 26 strain. *Annals of Microbiology*, 2015; 65: 2161-70.
<https://doi.org/10.1007/s13213-015-1056-7>