Journal of Microbial World
Volume 17, No. 3, December 2024

Original Article

Microencapsulation of probiotic microbes isolated from Effluent of dairy factories using alginate – Ganoderma

Sara Bagheri Farahani [1], Hamid Azadegan Ghomi [2], Mohadeseh Larypoor [3]

[1] MSc, Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran.
[3] Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objectives: The demand for non-dairy probiotic food products has encouraged scientists to explore these matrices. This research aimed to investigate the effects of encapsulating probiotics isolated from dairy sources using alginate and *Ganoderma lucidum* polysaccharides.

Materials and methods: This research employed an experimental-descriptive design. Initially, 30 samples of wastewater were collected from dairy factories around Arak, and bacterial and yeast isolates were obtained. Subsequently, Ganoderma lucidum polysaccharides were extracted and analyzed using FTIR. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using bacterial 16S and yeast 18S primers. Finally, the effect of encapsulating the isolates using sodium alginate and *Ganoderma lucidum* polysaccharides on industrial apple juice was investigated.

Results: In this test, two isolates, Saccharomyces cerevisiae strain CEN.PK 113-7 and Lactobacillus delbrueckii strain 4040, were isolated. Following encapsulation, these isolates exhibited greater growth compared to their free state. The results of this study indicated that the preservation of the sensory characteristics of the apple juice was maintained for 60 days of storage with the encapsulated bacteria, sodium alginate, polysaccharide, and yeast, in contrast to the free bacteria and yeast. Furthermore, the viability of the bacteria was enhanced. The combination of Lactobacillus delbrueckii strain 4040, sodium alginate, and *Ganoderma lucidum* polysaccharides in apple juice demonstrated the best performance in protecting the bacteria within the capsules.

Conclusion: The results of this study demonstrated that the use of encapsulated strains with biocompatible compounds not only preserved the sensory characteristics of the food product but also prevented food spoilage.

Key words: Probiotic, Encapsulation, *Ganoderma lucidum*, Sodium alginate.

Received: 30 August 2024 Revised: 6 October 2024 Accepted: 30 November 2024

Correspondence to: Mohadeseh Larypoor
Tel: +98 9122885346
E-mail: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

Journal of Microbial World 2024, 17 (3): 165 - 181

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفدهم، شماره سوم (پیاپی ٦٠) پاییز ١٤٠٣
صفحات ١٨١ –١٦٥

Original Article

ریزپوشانی میکروب‌های پروبیوتیک جدا شده از پساب کارخانجات لبنیات با استفاده از آلژینات -گانودرما

سارا باقری‌فراهانی[1]، حمید آزادگان قمی[2]، محدثه لاری‌پور[3]*

[1] کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال ، تهران، ایران. [2] استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران.
[3] دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: تقاضا برای محصولات غذایی پروبیوتیک غیرلبنی، باعث تشویق دانشمندان به کشف این ماتریس‌ها شده است. در این تحقیق هدف بررسی اثرات کپسوله کردن پروبیوتیک‌های جدا شده از لبنیات به وسیله آلژینات و پلی‌ساکاریدهای *گانودرما لوسیدوم* بود.

مواد و روش‌ها: این پژوهش از نوع تجربی‌توصیفی است. ابتدا ٣٠ نمونه از پساب کارخانجات لبنیات اطراف اراک تهیه و جدایه‌های باکتریایی و مخمری جداسازی شدند. پس از آن پلی ساکاریدهای *گانودرما لوسیدوم* استخراج و FTIR انجام شد. در تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز پرایمر باکتری، ١٦ S و مخمر ١٨ S بود. نهایتا اثر کپسوله کردن جدایه‌ها با استفاده از آلژینات سدیم و پلی ساکاریدهای *گانودرما لوسیدوم* روی آبمیوه‌ی سیب صنعتی بررسی شد.

یافته‌ها: در این آزمون ٢ جدایه به ترتیب *ساکارومایسس سروزیه* سویه CEN.PK ١١٣-٧ دی و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* سویه ٤٠٤٠ جداسازی شدند که بعد از کپسوله شدن رشد بیشتری نسبت به حالت آزاد داشتند. نتایج این مطالعه نشان داد ماندگاری ویژگی‌های حسی آبمیوه با استفاده از باکتری، آلژینات سدیم و پلی ساکارید و مخمرکپسوله شده نسبت به باکتری و مخمر آزاد بعد از ٦٠ روز نگهداری حفظ شد و زنده‌مانی باکتری افزایش داشت. برای محافظت از باکتری‌ها در کپسول، بهترین عملکرد را ترکیب باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* سویه ٤٠٤٠، آلژینات سدیم و پلی ساکاریدهای *گانودرما لوسیدوم* در آبمیوه سیب داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه مشخص کرد استفاده از سویه‌های کپسوله شده با ترکیبات زیست سازگار، نه تنها ویژگی‌های حسی ماده غذایی را حفظ کرده، بلکه از فساد موادغذایی نیز جلوگیری می‌کنند.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، انکپسولاسیون، *گانودرما لوسیدوم*، آلژینات سدیم.

دریافت مقاله: ١٤٠٣/٦/٩ ویرایش مقاله: ١٤٠٣/٧/١٥ پذیرش مقاله: ١٤٠٣/٩/١٠

مقدمه

امروزه مصرف‌کنندگان علاوه بر توجه به ویژگی‌های تغذیه ای، به خصوصیات سلامت بخش محصولات غذایی هم بسیار اهمیت می‌دهند. به ماده غذایی که نه تنها خواص تغذیه‌ای پایه، بلکه حداقل یک ویژگی سلامت بخش مشخص داشته باشد، ماده غذایی فراسودمند می‌گویند (١). از رایج‌ترین انواع غذاهای فراسودمند، فرآورده‌های پروبیوتیک (Probiotic) هستند (٢). اگر پروبیوتیک‌ها به‌طور منظم مصرف شوند فواید

*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.
تلفن: ٠٩١٢٢٨٨٥٣٤٦ پست الکترونیک: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

بسیاری مانند بهبود هضم لاکتوز، بهبود عملکرد روده با ایجاد تعادل میکروبی و ... را شامل می‌شوند (۲). بعضی از باکتری‌های اسید لاکتیک به طورگسترده ای به عنوان پروبیوتیک در انسان و حیوانات استفاده می‌شوند (۳و٤). قارچ‌های خوراکی قارچ‌های بزرگی هستند که می‌توانند برای غذا یا دارو استفاده شوند (۵). قارچ گانودرما لوسیدوم (GanodermLusidum) یک داروی شناخته شده است که برای درمان اختلالات متابولیک مختلف استفاده می‌شود (٦). *گانودرما لوسیدوم* سرشار از انواع مختلفی از تری ترپنوئیدها، استروئیدها، پپتیدها، نوکلئوتیدها و پلی‌ساکاریدها است (۷). اخیرا اشاره شده که کیفیت *گانودرما لوسیدوم* به طور مستقیم با محتوای تری ترپنوئیدها و پلی ساکاریدها متناسب است (۸). بیش از صد نوع پلی ساکارید از این قارچ‌ها تاکنون جدا شده است. بر اساس چندین مطالعه مخمرهای پروبیوتیک نیز به خصوص *ساکارومایسس سرویزیه* در کاهش عوارض جانبی درمان‌ها علیه *هلیکوباکترپیلوری* (Helicobacter Pylori) نقش داشته‌اند (۹). اخیرا به منظور افزایش بقای پروبیوتیک‌ها، روش‌های متفاوتی از جمله روش انکپسولاسیون (Encapsulation)، استفاده می‌شود (۳). فرمولاسیون محصول تجاری پروبیوتیک‌ها همراه با منابع کربن ویژه محرک رشد به نام پری‌بیوتیک‌ها نیز در میان مصرف کنندگان و پزشکان پذیرفته شده است (۱۰). تحقیقات نشان داده که پری بیوتیک‌ها نیز فعالیت ضدسرطانی دارند (۱۱). کپسولاسیون را فرآیندی می‌گویند که در آن یک لایه پوششی، ذرات جامد کوچک، قطرات مایع یا گازها را به دام می‌اندازد، یا در یک ماتریس همگن یا ناهمگن ادغام شده و کپسول‌های کوچکی با خواص مفید در حفاظت، بی حرکتی، رهاسازی کنترل شده، ساختار و کارکرد سازی تولید می کنند (۱۲). انتخاب یک روش کپسوله سازی مناسب به پارامترهای مختلفی بستگی دارد (۱۳و١٤). اگر روش کپسوله‌سازی به صورت درست انجام شود، مزایای بسیاری دارد (۱۵). در فرآیندهای کپسوله‌سازی امولسیون، یعنی سوسپانسیونی که سلول و پلیمر پروبیوتیک دارد (فاز پراکنده)در روغن نباتی (فاز پیوسته)پراکنده می‌شود و بعد از آن در حضور یک سورفکتانت (امولسیفایر) برای تشکیل امولسیون (Emulsion) آب در روغن همگن می‌شود. کلرید کلسیم (عامل اتصال متقابل) پس از امولسیون‌سازی، برای غیر محلول شدن و سخت شدن (فرایند ژل شدن سریع) بیوپلیمر محلول در آب اضافه می‌شود. در آخر دانه‌های ژل را با فیلتراسیون یا سانتریفیوژ می‌توان برداشت کرد. روش امولسیون برای تولید انبوه آسان‌تر بوده و به همین دلیل برای کاربرد در سطح صنعتی مناسب‌تر است و پس از کپسوله‌سازی با این روش، بقای بالایی از پروبیوتیک‌ها گزارش شده است (١٦). همینطور چون می‌توان اندازه مهره‌ها را تنظیم کرد روشی انعطاف پذیر است (۱۷). یک ماده کپسوله‌سازی برای مؤثر بودن باید توانایی حفاظت از پروبیوتیک‌های محصور شده در طول دستگاه گوارش تا رسیدن به محل هدف را داشته باشد و تنها زمانی که در معرض شرایط محیطی خاص قرار گیرد و تحریک شود باید پروبیوتیک‌های کپسوله شده را آزاد کند. رایج ترین بیومتریال در بین پلیمرهای کربوهیدراتی که استفاده می‌شوند، آلژینات (Alginate) است که فراوان بوده، قیمت نسبتا پایین دارد، ماهیت غیر مضر داشته، سهولت در تولید دانه‌های قوی دارد و سریعا در دسترس است (۱۸). همچنین ژل، متعادل کننده و غلیظ کننده خوبی است و به راحتی قابل دستکاری، زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر است (۱۹). آلژینات از آزاد شدن پروبیوتیک‌های محصور شده از دانه‌ها جلوگیری می‌کند. وقتی دانه‌ها با شرایط قلیایی به روده کوچک می‌رسند، آلژینات به یک لایه اسید آلژینیک (Alginic acid) محلول تبدیل شده و آن‌ها متورم می‌شوند و پروبیوتیک‌های کپسوله شده را آزاد می‌کنند (۲۰). ولی به دلیل حساس و ناپایدار بودن آن به حرارت و همچنین تحرک مولکولی بالا و برهمکنش ضعیف بین زنجیره‌های مولکولی، دارای خواص بازدارنده ضعیفی است. این ضعف را از طریق یک واکنش اتصال عرضی با کاتیون‌های دو ظرفیتی یا هم‌پوشانی با نشاسته یا با پوشش دادن کپسول‌های آلژینات با یک لایه اضافی (تکنیک چند لایه)ساخته شده از نوع متفاوتی از مواد زیستی می‌توان برطرف کرد (۲۱). آلژینات سدیم پلی

ساکاریدی طبیعی، زیست تخریب پذیر، زیست سازگار و بی خطر برای بدن می‌باشد (۲۲و۲۳). درشت مغذی‌های اصلی در آب میوه‌ها، کربوهیدرات‌ها و فیبرهای غذایی بوده که سرشار از ویتامین‌ها، موادمعدنی، پلی‌فنول‌ها (Polyphenols)، فیتوکمیکال‌ها (Phytochemicals) و آنتی‌اکسیدان‌ها (Antioxidants) هستند. همچنین آب میوه‌ها به‌عنوان حامل‌های امیدوارکننده برای پروبیوتیک‌ها برای همه گروه‌های سنی و نیز اقتصادی شناخته شده‌اند (۲٤). باکتری‌های اسید لاکتیک کربوهیدرات‌های موجود در آب میوه‌ها را تخمیر کرده و اسید لاکتیک(Lactic acid) تولید می‌کنند که تخمیر باعث بهبود طعم و بافت شده و تغذیه و کیفیت و عمر مفید آب میوه‌ها را افزایش می‌دهد (۲۵). خوردن سیب موجب کاهش خطر ابتلا به بیماری‌ها می‌شود. اما فرآوری صنعتی آب سیب تغییرات نامطلوب فیزیکی، شیمیایی و تغذیه ای در محصولات را باعث می‌شود که آب سیب تخمیر شده توسط باکتری‌های لاکتیک اسید از موثرترین و راحت ترین روش‌ها برای بهبود این وضعیت می‌باشد (۲٦).

مواد و روش‌ها

الف) نمونه‌برداری از پساب کارخانجات لبنیات: به‌منظور نمونه‌برداری بر اساس فرمول کوکران ۳۰ نمونه از پساب کارخانجات لبنیات اطراف شهر اراک با حجم ثابت یک لیتر در فالکون‌های ۲۰cc از خروجی حوض متعادل‌ساز انجام شد (۳ بار نمونه‌برداری). سپس در لوله‌های ۵cc سانتریفیوژ شده و کشت داده شد (۲۷).

ب) کشت نمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت اختصاصی: جهت جداسازی باکتری‌های لاکتیک‌اسید نمونه‌های لبنیات بر روی محیط کشت من روگوسا شارپ Sharpe (Man Rogosa) آگار کشت داده شدند و به مدت ٤۸ ساعت در دما ۳۷ درجه سلسیوس درون جار بی‌هوازی قرار گرفتند و برای جداسازی مخمرها ازمحیط کشت عصاره مخمر (Yeast Extract Agar) استفاده شد و پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند (۲۸).

ج) شناسایی مورفولوژی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی باکتری‌های لاکتیک: رنگ، مورفولوژی، شکل وحالت کلنی وخصوصیات میکروسکوپی با رنگ‌آمیزی‌گرم بررسی و ثبت شد. نمونه استاندارد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ٤۷٦۸ در انجام آزمون‌هایی تاییدی جدایه‌ها و تست‌های پروبیوتیکی در طول آزمون ها استفاده شد. برای هر جدایه خالص‌سازی شده تست جذب و تخمیر قند، تست جذب ازت، تست کاتالاز و تست اکسیداز انجام شد.

د) شناسایی مورفولوژی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی مخمر: رنگ، مورفولوژی، شکل و حالت کلنی بر روی محیط‌کشت پتیتو دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar) عصاره مخمر و بررسی شد. لام‌ها با استفاده از لاکتوفنل کاتن بلو رنگ‌آمیزی و مشاهده شد (۲۹). تست‌های تکمیلی جذب و تخمیر قندها، تست جذب ازت، تست تولید آسکواسپور انجام شد. تمام تست‌ها برای استانداردسازی با سویه استاندارد *ساکارومایسس سرویزیه* انجام شد (۳۰).

ه) انجام تست‌های تخمین خصوصیت پروبیوتیکی: برای انجام تست‌های ذیل از سوسپانسیون استاندارد مطابق نیم مک فارلند (جذب ۰/۱ تا ۰/۰۸ در طول‌موج نانومتر٦۲۵ معادله ۱/۵ × ۸۱۰CFU/ml) استفاده شد. همه تست‌ها سه بار تکرار و در نهایت منحنی رشد جدایه‌ها رسم شد.

۱) تست آنتی‌بیوگرام: برای انجام این تست از محیط مولرهینتون آگار استفاده شد و بر اساس استاندارد CLSI2021 میزان حساسیت و مقاومت سویه‌های باکتریایی و مخمری را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد بر اساس قطر هاله عدم رشد اندازه گرفته شد. جدایه‌هایی که حساسیت بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها داشتند برای تست‌های بعدی انتخاب شدند. دیسک‌های فلوکونازول، کتوکونازول و آمفوتریپسین B برای سویه‌های مخمر و دیسک‌های تتراسایکلین، کلیندامایسین، جنتامایسین، کلرامفنیکل برای سویه‌های باکتری استفاده شد.

۲) بررسی مقاومت به حرارت: سوسپانسیون استاندارد جدایه‌های مخمر و باکتریایی به محیط کشت سابرو دکستروز براث و من روگوسا شارپ براث اضافه شد و در دماهای ۲۵،

۳۰، ۳۷ و ٤۲ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. سپس در ساعت‌های ۰، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ میزان رشد آن‌ها با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ٦۲٥nm خوانش شد (۳۱).

۳) بررسی مقاومت به شرایط اسیدی و قلیایی: سوسپانسیون استاندارد جدایه‌های مخمر و باکتریایی به محیط کشت سابرو دکستروز براث و من روگوسا شارپ براث اضافه با استفاده از هیدروکلریک‌اسید ۱ نرمال و سدیم هیدروکسید، اسیدیته ۱/٥، ۲، ۳ و ٥ برای هر دو محیط تنظیم شد. محیط‌ها را بعد از تنظیم اسیدیته، اتوکلاو کرده و بعد اتمام آن و خنک شدن محیط‌ها، سوسپانسیون استاندارد جدایه‌های باکتریایی و مخمری به آن اضافه شد. سپس در ساعت‌های ۰، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ٦۲٥nm خوانش انجام شد (۳۰و۳۲).

٤) بررسی مقاومت به نمک‌های صفراوی: سوسپانسیون استاندارد جدایه‌های مخمر و باکتریایی به محیط کشت سابرو دکستروز براث و من روگوسا شارپ براث اضافه شد. نمک‌های صفراوی) سدیم کولات و سدیم دزوکسیکولات (به مقدار ۰/۳ درصد به هر دو محیط اضافه سپس محیط‌ها را اتوکلاو کرده و سوسپانسیون استاندارد جدایه‌های باکتریایی و مخمری به آن اضافه شد. سپس درساعت‌های ۰، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ٦۲٥nm خوانش انجام شد (۳۲).

و) شناسایی مولکولی: سویه‌های برتر از نظر خصوصیات نسبی پروبیوتیکی برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند. ابتدا استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت پویا ژن آزما (ایران) انجام شد. جهت اطمینان از صحت استخراج DNA با استفاده از سیستم الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز ۱ درصد درون TBE (بافرتریس بوراتاتیدیوم بروماید) الکتروفورز گردید. سپس با استفاده از دستگاه ژل داک صحت نمونه ژن استخراج شده تأیید گردید. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش (با استفاده نرم‌افزار ژن رانر و سایت NCBI) بر طبق مقالات و توسط شرکت ژن فناوران (ایران) طراحی شد که در جدول ۱ نشان داده شده است.

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

Nucleotide sequence of 18srRNA for yeast		(bp)	Tm (C°)	Source
Forward	AGCTGGTTGATTCTGCCAG	19	53	current study
Reverse	TGATCCTCCYGCAAGTTCAC	20	53	
Nucleotide sequence of 16srRNA for bacteria		(bp)	Tm (C°)	Source
Forward	AGAGGTTCCTGAGCTCAG	19	53	current study
Reverse	ACAGCTTCCTTGTTACGATT	20	53	

سپس بر طبق برنامه دمایی جدول ۲ Taq 2x MASTER MIX (شرکت امپلیکون دانمارک) اضافه و داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد.

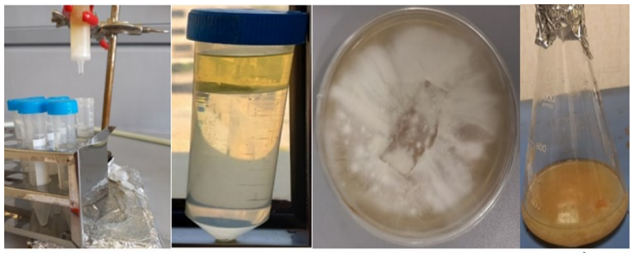
جدول ۲: برنامه زمان‌بندی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای الف) مخمر، ب) باکتری.

ردیف الف	تعداد چرخه	زمان	دما
۱	۱	۳ دقیقه	۹٥ درجه اول
۲	۳٥	۳۰ ثانیه	۹٥ درجه دوم
۳	۳٥	۲۰ ثانیه	٥٥ درجه
٤	۳٥	۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه	۷۲ درجه اول
٥	۱	٥ دقیقه	۷۲ درجه دوم

ردیف ب	تعداد چرخه	زمان	دما
۱	۱	۳ دقیقه	۹٥ درجه اول
۲	۳٥	۲۰ ثانیه	۹٥ درجه دوم
۳	۳٥	۲۰ ثانیه	٥۲ درجه
٤	۳٥	۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه	۷۲ درجه اول
٥	۱	٥ دقیقه	۷۲ درجه دوم

ز) استخراج پلی‌ساکاریدهای قارچ گانودرما لوسیدوم: میسلیوم قارچ *گانودرما لوسیدوم* از آزمایشگاه قارچ شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال تهیه شد. سپس بر روی محیط پتیتودکستروز آگار و پتیتودکستروز براث (Potato Dextrose Broth) کشت و به مدت ١٤ روز در دمای

۲۵ درجه سلسیوس در دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شد (شکل ۱ الف). پس از آن به منظور تهیه بیومس از فرآیند لیوفیلزاسیون به مدت ۲٤ ساعت در فشار ٦٥ بار در دمای ٦٠ درجه سلسیوس و دمای ۳۰ درجه سلسیوس استفاده شد. به منظور استخراج پلی‌ساکارید از روش فنل‌سولفوریک‌اسید استفاده شد و با استفاده از معرف سویج تعیین حجم شد. تشکیل سه لایه مختلف (لایه رسوبی میانی حاوی پروتین در حین استخراج به نمایش گذاشته شده است (شکل ۱ ج) (۳۳). جهت خالص‌سازی بیشتر پلی‌ساکارید استخراج شده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی دی اتیل آمینو اتیل سفادکس ۲۵–A استفاده گردید (شکل ۱ ج). ستون با یک شیب خطی از محلول ۰ تا ۰/۲ مولار نمک طعام با جریانی با سرعت ۰/٤٤ میلی‌لیتر در دقیقه شسته و ذره‌های کوچک خروجی با میکروتیوپ به مقدار ۲ میلی‌لیتر در هر یک جمع‌آوری و به منظور تعیین غلظت مورد بررسی واقع گردید (۳۰) (شکل ۱ د). نهایتا شناسایی ساختار پلی‌ساکارید استخراج شده با روش تبدیل فوری مادون قرمز از ۱٤۰۰۰cm تا ۱٦٥۰cm با قدرت تفکیک ۱۱cm ثبت ومحل پیوندها بر روی پیک‌ها تعیین شد (۳۰).



شکل ۱: الف و ب) میسلیوم قارچ بر روی محیط مایع وجامد PDA، ج) تشکیل سه لایه مختلف در حین استخراج، د) ستون کروماتوگرافی تعویض یونی دی اتیل آمینو اتیل سفادکس A۲۵.

ح) آماده‌سازی ترکیب ریزپوشانی کننده‌ی آلژینات و پلی‌ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم: جدایه‌های شناسایی شده شامل باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* ٤۰٤۰ وگونه مخمر *ساکارومایسس سرویزیه‌ادی- CEN.PK* می‌باشد که جهت ریزپوشانی استفاده و با گونه‌های استاندارد مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* و باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ٤۷٦۸* مقایسه شدند.

پس از خالص‌سازی پلی‌ساکاریدهای *گانودرما لوسیدوم*، پودر آلژینات سدیم جهت ریزپوشانی از شرکت سیگما-آلدریچ آمریکا تهیه شد. ابتدا ۳ گرم آلژینات سدیم و ۲ گرم پلی‌ساکاریدهای *گانودرما لوسیدوم* به آرامی به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. پس از حل شدن در اتوکلاو استریل شد و پس از آن که محلول با محیط هم دما شد، محلول آلژینات با سوسپانسیون (٪ ۰/۱) میکروبی به مدت ٥ دقیقه مخلوط شد تا همگن شود. برای تشکیل امولسیون، مخلوط حاصل به ۲٥۰ میلی‌لیتر روغن زیتون حاوی ۲/۰ درصد امولسیفایر توئین ۸۰ (شرکت مرک، آلمان) ریخته شد. با استفاده از همزن مغناطیسی (سرعت۵۰۰ rpm) به مدت ۳۰ دقیقه امولسیون یکنواختی تشکیل شد. به منظور تشکیل کپسول‌ها به محلول مورد نظر کلریدکلسیم ۰/۱ مولار اضافه و پس از ۳۰ دقیقه که کپسول‌ها ته نشین شدند، به منظور جداسازی کپسول‌ها از سانتریفیوژ (۱۷۷۰rpm) به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. کپسول‌های جدا شده با محلول آب پپتونه ۰/۱ درصد شسته شد و در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شد.

ط) شمارش باکتری‌ها و مخمرها به دام افتاده در کپسول: ۱ گرم از کپسول‌های تهیه شده با ۹ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار استریل بافر فسفات به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق هم‌زده شد تا کپسول‌ها به طور کامل حل و آزاد شوند. سپس باکتری‌ها در محیط MRS ومخمرها در محیط پتیتودکستروزآگار کشت داده شدند به مدت ٤۸ ساعت باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و مخمرها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. شمارش باکتری‌ها در ۳ تکرار صورت پذیرفت (۳٤).

ی) بررسی شکل و اندازه‌ی کپسول‌ها: شکل ذرات به وسیله میکروسکوپ نوری مدل (Motic BA300) با بزرگنمایی ٤۰ بررسی شد. برای تعیین اندازه ذرات از میکروسکوپ اینورت استفاده شد.

ک) بررسی مقاومت به حرارت نمونه‌های ریزپوشانی: به محیط

کشت سابرو دکستروز براث و من روگوسا شارپ براث، به ترتیب مقداری از جدایه‌های مخمر و باکتریایی ریزپوشانی به محیط کشت تازه اضافه شد. به طوری که کدورت محیط بعد از اضافه شدن کلنی‌ها برابر با نیم مک فارلند، به‌عنوان استاندارد و شاهد باشد. محیط کشت‌های مورد نظر در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۲ سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. 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.

ل) بررسی مقاومت به شرایط اسیدی و قلیایی نمونه‌های ریزپوشانی: برای این تست محیط‌کشت سابرو دکستروز براث و من روگوسا شارپ براث ساخته شد. با استفاده از هیدروکلریک‌اسید ۱ نرمال و سدیم هیدروکسید، اسیدیته ۵/۱، ۲، ۳ و ۵ برای هر دو محیط تنظیم شد. محیط‌ها بعد از تنظیم اسیدیته، اتوکلاو کرده و بعد از خنک شدن محیط‌ها، هریک از جدایه‌های 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 طول‌موج ۶۲۵ نانومتر خوانش انجام شد.

م) آماده‌سازی نوشیدنی آب سیب: آبمیوه‌ی صنعتی سیب تهیه شد. سپس با استفاده از شکر و آب از بریکس ۷۰ به بریکس ۱۲ رسانده شدند، سپس به مدت ۲۰دقیقه در ۸۰ درجه سلسیوس پاستوریزه گردید. روند تغییرات اسیدیته در طول مدت نگهداری آب میوه‌ها با پروبیوتیک توسط دستگاه سنجش اسیدیته اندازه‌گیری شد. میزان مواد جامد محلول در آب توسط دستگاه رفراکتومتر اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ی نوشیدنی از لحاظ طعم، عطر، بافت و رنگ به صورت مقایسه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. برای شستشوی ذائقه و طعم نمونه‌ها از آب استفاده شد بر اساس مقیاس هدونیک از یک برای نمونه ضعیف و ده برای نمونه عالی اختصاص داده شد.

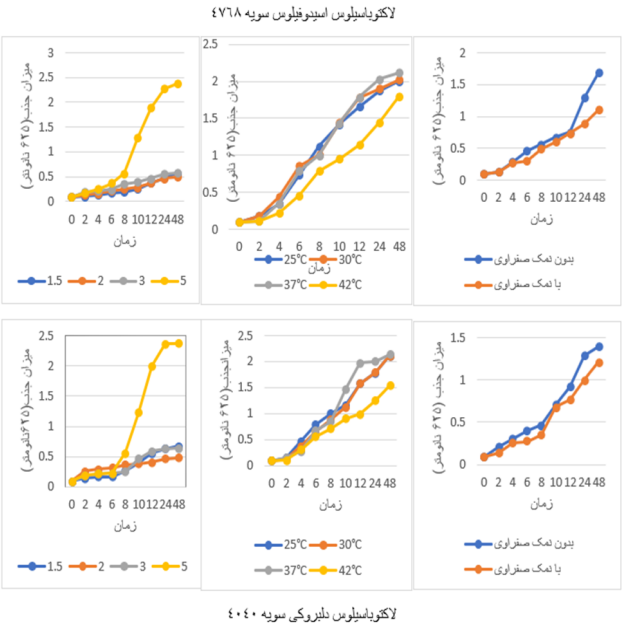
یافته‌ها

الف) نتایج نمونه‌برداری، خالص‌سازی ومشاهده میکروسکوپی: پس از نمونه‌برداری و خالص‌سازی ۱۵ جدایه باکتری (B1-B10) و ۱۵ جدایه مخمری (Y1-Y10) جدا شدند.

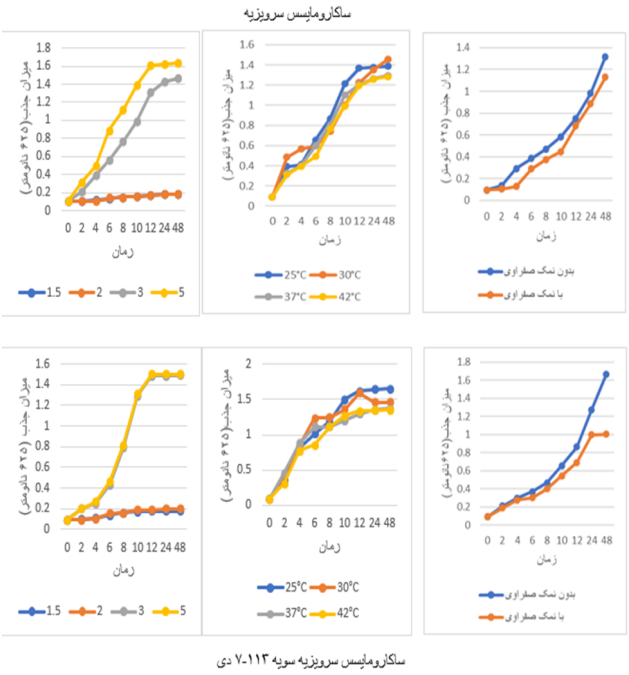
ب) تست‌های بیوشیمیایی: تست‌های تخمیر قند، احیای نیترات، کاتالاز و اکسیداز برای جدایه‌های باکتری و قارچ انجام شد.

ج) نتایج تست آنتی‌بیوگرام جدایه‌ها در مقایسه با نتایج تست آنتی‌بیوگرام جدایه‌های انتخابی ریزپوشانی: اندازه قطر هاله‌ها درجدایه‌های قارچی و باکتریایی بررسی شد. در نمونه Y8 قطر هاله آمفوتریسین ۱۱B mm (نیمه حساس)، کتوکونازول ۲۲ mm (حساس) و فلوکونازول بدون هاله (مقاوم) بود. در جدایه B1 قطرهاله تتراسایکلین ۲۰mm (حساس)، کلرامفنیکل ۳۵ mm (حساس)، کلیندامایسین ۳۰ mm (حساس) و جنتامایسین ۹ mm (نیمه حساس) بود.

د) نتایج تست‌های پروبیوتیکی: منحنی رشد *لاکتوباسیلوس* استاندارد در محدوده دما، نمک صفراوی و اسیدیته رسم شد. نمونه استاندارد در اسیدیته ۵، دمای ۳۷ درجه سلسیوس بهترین میزان رشد را داشت و درحضور نمک صفراوی کاهش چشمگیری در رشد ایجاد شده بود. جدایه B1 در اسیدیته ۵ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس بهترین رشد را داشت و درحضور نمک صفراوی توانایی رشد داشت. این نمودارها با منحنی رشد جدایه باکتری جهت مشخص کردن خصوصیات نسبی پروبیوتیک مقایسه شد که در شکل ۲ مشاهده می‌شود.



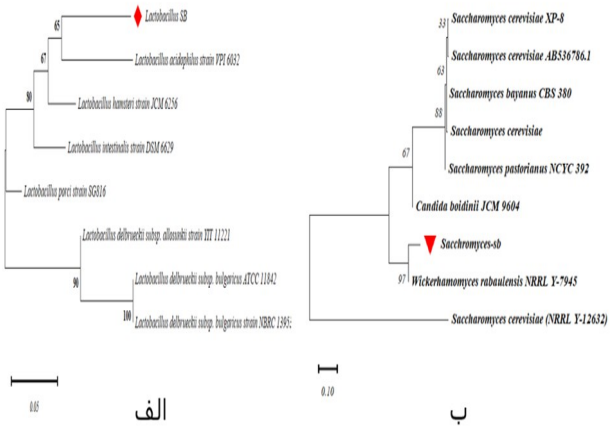
شکل ۲: منحنی رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* سویه *۴۷۶۸* (بالا)و جدایه باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* سویه *۴۰۴۰* (پایین)در محدوده دما، نمک صفراوی و اسیدیته.



شکل ۳: منحنی رشد مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* (بالا)و جدایه مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* سویه *۱۱۳CEN.PK-۷ دی* (پایین)در محدوده دما، نمک صفراوی و اسیدیته.

نمونه استاندارد مخمری در pH، دماهای متفاوت و در حضور نمک صفراوی با دستگاه اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). نمونه استاندارد در اسیدیته ۵ بهترین رشد را داشت و هچنین اسیدیته ۳ رشد بهتری نسبت به اسیدیته ۱/۵ و اسیدیته ۲ داشت.نمونه استاندارد در دمای ۲۵ C° و ۳۰ C° که رشد نسبتا نزدیکی به هم داشتند، بهترین رشد و سازگاری را نسبت به دماهای دیگر داشت. با توجه به تصاعدی بودن دمای ۴۲C°، رشد مطلوبی نداشت. همچنین سویه استاندارد مورد نظر توانایی رشد در حضور این نمک را دارد.

ه) نتایج شناسایی مولکولی: نتایج بلاست توالی در پایگاه داده NCBI نشان داد که که جدایه باکتری با درصد تشابه ۹۸/۹۱ درصد به‌عنوان *لاکتوباسیلوس دلبروکی* سویه ۴۰۴۰ و جدایه مخمر با درصد تشابه ۹۷/۵۴ درصد به‌عنوان *ساکارومایسس سرویزیه* سویه *۱۱۳CEN.PK-۷ دی* شناسایی شدند. همچنین درخت فیلوژنی این سویه‌ها با استفاده از نرم افزارمگا ۷ روش ماکزیمم لایک لیهود، بوت استرپ ۵۰۰ رسم گردید.

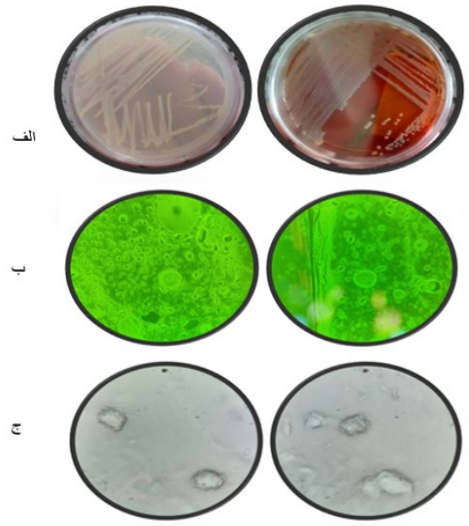


شکل ٤: درخت فیلوژنی الف) جدایه باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* سویه ۴۰۴۰ ب) مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* سویه *۱۱۳CEN.PK-۷ دی* (Maximum likelihood method).

درخت فیلوژنتیکی با استفاده توالی ۱٦S rRNA برای باکتری و۱۸ S rRNAبرای مخمر و با نرم افزار مگا۱۱ رسم شده با روش بیشینه درست نمایی(Maximum likelihood)، بوت استرپ(Bootstrap) ۱۰۰، فاصله تکاملی با استفاده از روش Maximum Composite Likelihood محاسبه شده است. مقیاس تفاوت (Distance scale) قارچ: ۰/۱ و باکتری ۰/۰۵ است. گونه های جدا شده *Saccharomyces cerevisiae* و *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*، با شباهت ۹۸/۹۱٪ *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* شناسایی شد. جدایه، با شباهت ۸۹/۳۰٪ *Saccharomyces cerevisiae NRRL Y-12632* شناسایی شد.

و) نتایج ریزپوشانی نمونه‌های جداسازی شده: چنانچه در شکل ۵ (الف) مشاهده می‌شود، نمونه ریزپوشانی بر روی محیط اختصاصی کشت داده شد و پس از ٤٨ ساعت کلنی‌ها رشد کرده ونشان از زندمانی جدایه‌ها بود. همچنین عکس میکروسکوپ اینورت (ب) و نوری (ج) نشان از تشکیل کپسول اطراف نمونه باکتریایی می‌باشد.

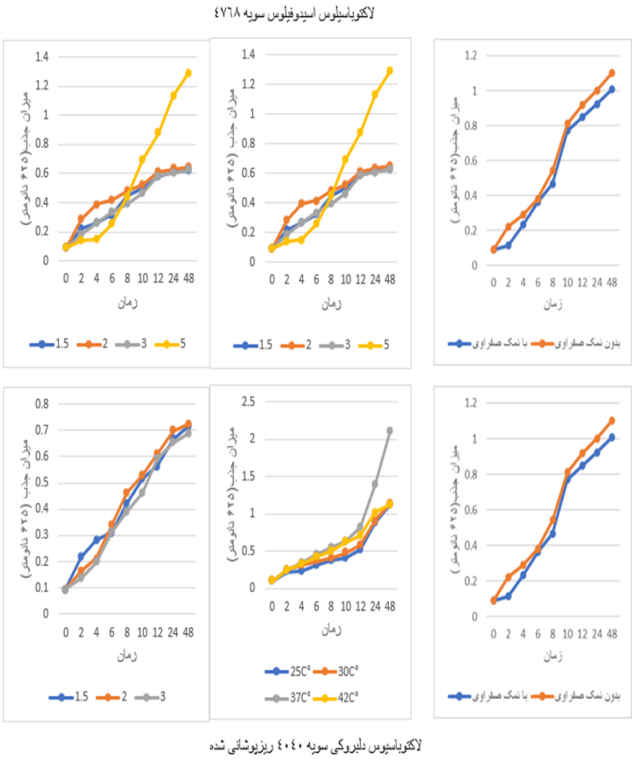
ز) نتایج رشد باکتری به دام افتاده در کپسول در مقایسه با نمونه استاندارد: میزان رشد جدایه‌های باکتری ومخمری نسبت به سوش استاندارد تفاوت شایانی ندارد اما جدایه‌ها در حالت ریزپوشانی رشد مناسب تری را دارند.



شکل ۵: الف) سمت راست نمونه‌های ریزپوشانی باکتری روی محیط من روگوسا شارپ و سمت چپ مخمر بر روی محیط عصاره مخمر پس از گذشت ۴۸ ساعت، ب) تصویر میکروسکوپ اینورت سمت راست نمونه باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* سویه ۴۰۴۰ و سمت چپ نمونه مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* سویه *CEN.PK۱۱۳-۷*دی با بزرگنمایی ×۴۰، ج) تصویر میکروسکوپ نوری سمت راست از کپسول باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* سویه ۴۰۴۰ و سمت چپ از کپسول مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* سویه *CEN.PK۱۱۳-۷* دی.

شکل ۶: بررسی نمودار میزان رشد نمونه ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* سویه ۴۰۴۰ (بالا)دردمای ۳۷ C° و ریزپوشانی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* سویه *CEN.PK۱۱۳-۷* دی ریزپوشانی (پایین) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در قیاس با نمونه استاندارد.

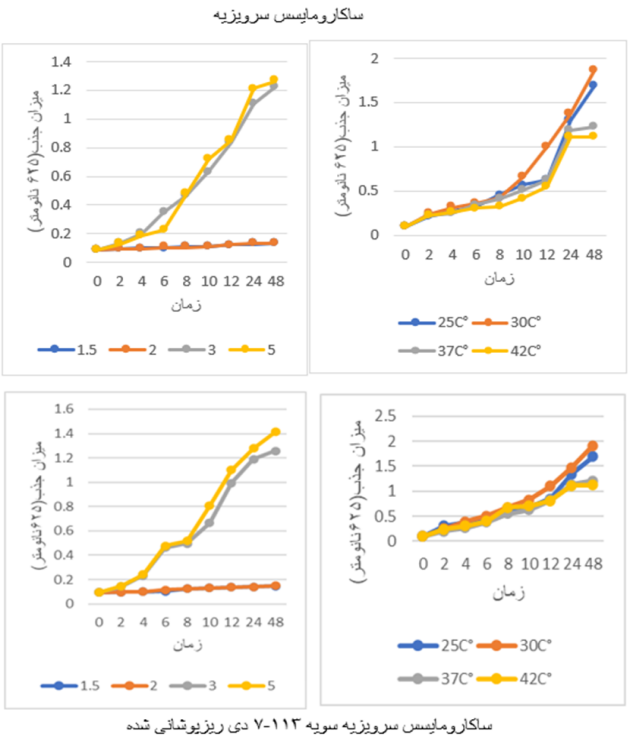
ح) نتایج بررسی میزان رشد جدایه‌های باکتریایی و مخمری در شرایط ریزپوشانی در شرایط استاندارد (شکل ۷)



شکل ۷: نمودار مقاومت به اسید و حرارت و نمک صفراوی نمونه ریزپوشانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* سویه *۴۷۶۸* (بالا) در قیاس با جدایه ریزپوشانی *لاکتوباسیلوس دلبروکی* سویه *۴۰۴۰* (پایین).

جدایه B1 ریزپوشانی در pH~۵ و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بهترین رشد را پس از ۴۸ ساعت داشت و در حضور نمک صفراوی مقاومت نشان داد. نمونه ریزپوشانی B1 در مقایسه با جدایه B1 آزاد رشد کمتری داشت ولی بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تست‌های پروبیوتیکی توانایی رشد خود را حفظ کرده بود که علت آن تشکیل لایه کپسول می‌باشد.

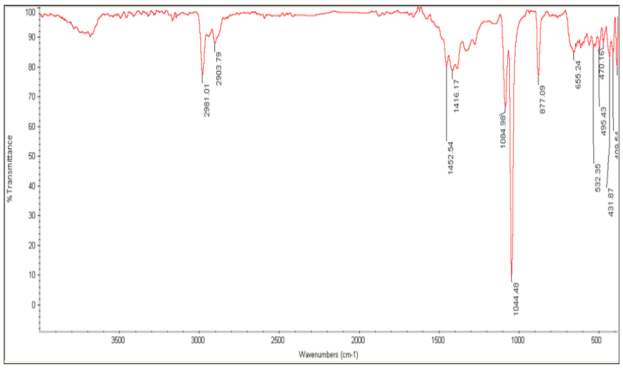
ط) نتایج رشد مخمر به دام افتاده در کپسول در مقایسه با نمونه استاندارد: هم جدایه مخمری وهم نمونه استاندارد نسبت به صفرا در شرایط ریزپوشانی وآزاد مقاومت نشان دادند. ریزپوشانی تاثیر معنی‌داری بر روی میزان رشد در شرایط اسیدی ودما نداشت بنابراین بهترین میزان رشد در اسیدیته ۵ و حرارت ۳۰ درجه سلسیوس همچنان که در نمودار شکل ۱۰ دیده می‌شود اتفاق افتاد.



شکل ۸: مقاومت به اسید و حرارت نمونه ریزپوشانی *ساکارومایسس سرویزیه* (بالا) در قیاس با جدایه ریزپوشانی *ساکارومایسس سرویزیه* سویه *CEN.PK ۱۱۳-۷ دی* (پایین).

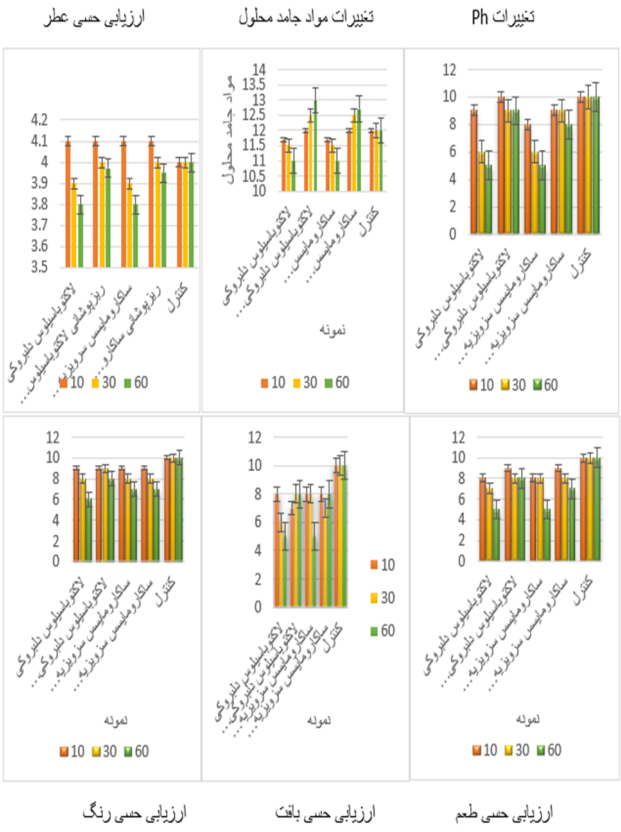
ی) نتایج طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ گانودرما لوسیدوم:

شکل ۹ نتایج طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ استخراج پلی‌ساکاریدهای قارچ *گانودرما لوسیدوم* را نشان می‌دهد. پیک‌هایی را در نواحی ۲۹۸۱ cm^{-1}، ۲۹۰۳ cm^{-1}، ۱۴۵۲ cm^{-1}، ۱۴۱۶ cm^{-1}، ۱۰۸۴ cm^{-1}، ۱۰۴۴ cm^{-1}، ۸۷۷ cm^{-1} ، ۶۵۵ cm^{-1} و ۶۵۳ cm^{-1} نشان می‌دهد. پیک دیده شده در ۲۸۴۰–۳۰۰۰ cm^{-1} نشان دهنده‌ی گروه‌های C-H کششی آلکان‌ها است. ۱۴۵۲ cm^{-1} نشان دهنده‌ی گروه‌های C-H خمشی آلکان‌ها است. ۱۴۰۰–۱۰۰۰ cm^{-1} نشان دهنده‌ی گروه‌های C-F کششی ترکیب فلوره است. ۸۷۷ cm^{-1} نشان دهنده‌ی گروه‌های C=C خمشی آلکان‌ها است. ۵۰۰–۶۰۰ cm^{-1} نشان دهنده‌ی گروه‌های C-I کششی ترکیبات هالیدی می‌باشد. نتایج به‌دست آمده نشان داد نمونه تولید شده مطابقت فراوانی با نمونه‌های به‌دست آمده از سایر تحقیقات مربوط به طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ داشت.



شکل ۹. نتایج FTIR پلی‌ساکاریدهای قارچ *گانودرما لوسیدوم*.

ک) نتایج ماندگاری جدایه‌ها درآبمیوه‌ها (شکل ۱۰)



شکل ۱۰: تغییرات pH، مواد جامد محلول، ارزیابی حسی عطر، طعم، بافت و رنگ تیمارهای مختلف در آبمیوه‌های مختلف در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس.

با توجه به داده‌های به دست آمده در شکل ۱۰، مشاهده شد که در آبمیوه صنعتی سیب تمامی تیمارهای حاوی باکتری و مخمر آزاد و انکپسوله شده با گذشت، زمان pH کاهش یافت

(p≤۰/۰۵). همچنین نتایج مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن نشان داد که بالاترین کاهش اسیدیته درتیمار حاوی باکتری (B1) و مخمر (Y8) به صورت آزاد از ٤/١٦ به ٣/٨٦ پس از نگهداری طی ٦٠ روز و همچنین بیشترین کاهش اسیدیته در تیمارهای انکپسوله مربوط به تیمار Y8C که از ٤,١ به ٣/٨٥ پس از نگهداری طی ٦٠ روز در دمای ٤ درجه سلسیوس می‌باشد.

ک) تغییرات مواد جامد محلول: نتایج تجزیه تحلیل آماری داده‌ها (شکل ١٠) نشان داد که اثر تیمار و زمان و اثر متقابل تیمار و زمان بر میزان مواد جامد محلول معنی‌دار بود (p≤۰/۰۵). در مقایسه، تیمارهای انکپسوله شده نسبت به تیمارهای آزاد افزایش معنی‌داری داشتند. مقدار مواد جامد محلول در آبمیوه انکپسوله شده با باکتری (B1C) در پایان دوره نگهداری بریکس آبمیوه صنعتی سیب به ١٣ افزایش یافت. مقدار مواد جامد محلول در آبمیوه انکپسوله شده با مخمر (Y8C) در پایان دوره نگهداری بریکس آبمیوه سیب به ١٢/٧ افزایش یافت.

ل) نتایج ارزیابی حسی عطر، طعم و بافت: ١) ارزیابی حسی عطر: ارزیابی حسی عطر در تیمارهای مختلف آبمیوه‌ی صنعتی سیب پروبیوتیک در مدت ٦٠ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس انجام شد (شکل١٠). نتایج تجزیه تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که اثر زمان در تیمارهای B1C و Y8C بر امتیاز عطر معنی‌دار بود. بالاترین امتیاز عطر بعد از نمونه کنترل، مربوط به تیمار B1C آبمیوه صنعتی سیب در روز١٠ بود.

٢) ارزیابی حسی طعم: ارزیابی حسی طعم در تیمارهای آبمیوه صنعتی سیب پروبیوتیک در مدت ٦٠ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس انجام شد (شکل١٠). نتایج تجزیه تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که اثر زمان در تیمارهای B1C وY8C بر امتیاز طعم معنی‌دار بود. بالاترین امتیاز طعم بعد از نمونه کنترل مربوط به B1و Y8 و Y8Cدر روز ١٠ و B1Cدر روز ١٠ و ٣٠ بود.

٣) ارزیابی حسی بافت: ارزیابی حسی بافت در تیمارهای آبمیوه صنعتی پروبیوتیک در مدت ٦٠ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس انجام شد (شکل١٠). نتایج تجزیه تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که اثر زمان در تیمارهای B1C و Y8C بر امتیاز طعم معنی‌دار بود. بالاترین امتیاز طعم بعد از نمونه کنترل مربوط به تیمار B1C در روزهای ٣٠ و ٦٠، B1 در روز ١٠، Y8 روز های ١٠ و ٣٠ و Y8C در روزهای ١٠ و ٦٠ بود.

٤) ارزیابی حسی رنگ: ارزیابی حسی رنگ در تیمارهای آبمیوه صنعتی پروبیوتیک در مدت ٦٠ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس انجام شد (شکل١٠). نتایج تجزیه تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که اثر زمان در تیمارهای B1C و Y8C بر امتیاز طعم معنی‌دار بود. بالاترین امتیاز رنگ بعد از نمونه کنترل مربوط به B1C و Y8C در روز ١٠ بود. 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 می‌باشد.

بحث

تقاضای فزاینده برای محصولات غذایی پروبیوتیک غیر لبنی، دانشمندان و محققان را تشویق کرده است تا ماتریس‌های جدید مواد غذایی غیر لبنی را کشف کنند. مطالعات اخیر ثابت کرده‌اند که ماتریس‌های غذایی غیرلبنی (که فاقد لاکتوز، آلرژن‌های لبنی، و کلسترول و سرشار از مواد مغذی هستند) وسیله‌ای امیدوارکننده برای تحویل پروبیوتیک هستند. علاوه بر این، مشاهده شد که پروبیوتیک‌ها به دلیل غنی بودن از مواد مغذی، به خوبی با کپسوله‌سازی با استفاده از ماتریس‌های غذایی غیر لبنی سازگار شدند. با این حال، محققان همچنان با چالش‌هایی مانند حفظ قابلیت حیات پروبیوتیک و خواص حسی محصولات غذایی پروبیوتیک مواجه هستند. پروبیوتیک‌ها معمولاً در ماتریس‌های غیر لبنی تکثیر نمی‌شوند، لازم است زنده ماندن پروبیوتیک‌ها در سطح کافی حفظ شود. اگرچه کپسولاسیون به طور گسترده گزارش شده است که در حفظ حیات پروبیوتیک‌ها در طول ذخیره سازی، تولید و هضم گوارشی موثر است، تکنیک‌ها و بیومواد مورد استفاده تا حد زیادی به سویه پروبیوتیک، ماتریکس غذا و روش تهیه غذا

بستگی دارد. بنابراین، انتخاب تکنیک‌ها و بیومواد مناسب برای کپسوله‌سازی و تحویل پروبیوتیک‌ها بسیار مهم است. بر اساس مطالعات ذکر شده، کپسوله‌سازی همزمان پروبیوتیک‌ها با پری‌بیوتیک‌ها در حفظ ماندگاری پروبیوتیک‌ها در ماتریس‌های مواد غذایی غیر لبنی مؤثرترین روش است (۲۴و۳۵و۳۶).

تحت تأثیر تعداد فزاینده‌ای از مطالعات در مورد *گانودرما لوسیدوم*، کاربردهای مدرن آن شامل درمان بیماری عروق کرونر قلب، تصلب شرایین، هپاتیت، آرتریت، نفریت، برونشیت، فشار خون بالا، سرطان و زخم معده است. اعتقاد بر این است که پلی ساکاریدهای *گانودرما لوسیدوم* یک مکانیسم ضد تومور غیرمستقیم را ایجاد می کنند که در آن سیستم ایمنی میزبان برای هدف قرار دادن سلول‌های تومور تغییر می‌کند (۳۷). میرمظلوم و همکاران در سال ۲۰۲۱ برای تحقیقاتشان از قارچ ریشی که دارویی با خواص مشهود می‌باشد استفاده کردند. برای افزایش عملکرد ماده قوی، *لاکتوباسیلوس* پروبیوتیک را نیز در مطالعه خود گنجاندند. آن‌ها دریافتند ترکیب مواد پری‌بیوتیک با باکتری‌های پروبیوتیک با استفاده از رویکرد ارائه شده می‌تواند فرصت‌های بی‌شماری را برای تولید انواع غذاها و نوشیدنی‌های کاربردی و همچنین غنی شده جدید با ثبات بیشتر اجزای فعال زیستی به همراه داشته باشد (۳۸).

در این مطالعه از پساب کارخانجات لبنیات اطراف اراک، ۳۰ نمونه لبنی مختلف شامل شیر، دوغ، ماست و کشک و پنیر تازه جمع‌آوری شد و در آخر ۲جدایه (۱ جدایه مخمر و۱ جدایه باکتری) از بین ۱۵ نمونه جدا و خالص‌سازی شدند. ایقبال و همکاران در سال ۲۰۲۱ دریافتند که سویه‌های *لاکتوباسیلوس* در دانه‌های آلژینات در مقایسه با کشت آزاد و تعداد میکروبی در دانه‌ها پایدارتر هستند. پاندی و همکاران در سال ۲۰۲۱ با مقایسه بین جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک محصور شده و غیرمحصور شده متوجه شدند که باکتری‌های اسیدلاکتیک میکروکپسوله شده با پتانسیل نگهداری بهتری نسبت به غیرکپسوله یافت می‌شوند. جوماژانوا و همکاران در سال ۲۰۲۳، دریافتند که روش کپسوله‌سازی در افزایش زنده ماندن باکتری‌های پروبیوتیک در مقایسه با سلول‌های آزاد بدون کپسول بسیار موثر بود. کپسول‌های آلژینات-ژلاتین به‌طور بالقوه می‌توانند به‌عنوان یک عامل انتقال ایمن و محافظ برای باکتری‌های پروبیوتیک زنده استفاده شوند. داده‌های زنده‌مانی همچنین نشان داد که کپسول‌های آلژینات-ژلاتین محافظت بهتری ارائه می‌کنند، که نشان می‌دهد نفوذ اسید کاهش یافته است. کپسول‌ها می‌توانند میکروارگانیسم‌های زنده را از طریق آب معده با اسیدیته پایین به روده کوچک برسانند، جایی که آن‌ها خواص عملکردی خود را بر روی بدن انسان اعمال می‌کنند. استانیزوسکی و ویاتر در سال ۲۰۲۱ متوجه شدند که علاوه بر *ساکارومایسس سرویزیه* که اثرات مفید بر سلامت انسان و تأثیر مثبت یا منفی آن بر ماتریس غذا گزارش شده است، مخمرهای دیگری با فعالیت پروبیوتیک بالقوه وجود دارد. در تحقیق حاضر نیز هم راستا با تحقیق ذکر شده به جداسازی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* و باکتری *لاکتوباسیلوس* پرداخته شد.

تعیین تحمل اسیدیته برای ۲ سویه، با اسیدیته های مختلف در ساعت‌های مختلف انجام شد که نتایج گزارش شده است. بر اساس درصد بقا، جدایه‌ها مقاومت خوبی را نشان دادند. تحقیقات مشابه انجام شده برای انتخاب جدایه‌های مقاوم به اسید با استفاده از محتوی معده گزارش شده است (۳۹). بررسی‌ها نشان دادند که بقای *لاکتوباسیلوس‌ها* در فسفات بافر سالین نسبت به محتوی معده، به خاطر اثر حفاظتی ترکیبات موجود در محتوی معده بر روی سلول‌های باکتریایی، اندکی پایین‌تر است. آن‌ها فسفات بافر سالین با اسیدیته مناسب را برای غربال سویه‌های باکتریایی، به منظور حفظ بقا در شرایط In vivo پیشنهاد کردند. در این مطالعه بعد از یافتن شرایط بهینه محیط شامل اسیدیته معادل ۵,۵، دما ۲۵ درجه سلسیوس و محیط کشت جامد و مایع به ترتیب عصاره مخمر و سابرو دکستروز براث تعیین گردید و کشت میسلیوم استخراج گانودرما از طریق روش استخراج آب گرم و رسوب‌گیری با اتانول از میسلیوم و جسم بارده قارچ *گانودرما لوسیدوم* انجام گرفت. سپس خالص‌سازی با استفاده از ستون کروماتوگرافی

تعویض یونی صورت گرفت و به دلیل غلظت بیشتر بدست آمده حاصل از تست فنل سولفوریک اسید از گانودرما موجود در استخراج میسلیومی استفاده و به منظور کپسوله‌کردن در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. Lee HH و همکاران در مطالعه‌ای مشابه با استفاده از روش استخراج آب گرم و رسوب به وسیله اتانول هم از میسلیوم و هم از جسم بارده خارج *گانودرما لوسیدوم* استخراج گانودرما را انجام دادند که نتایج حاکی بر مقدار بیشتر این پلی‌ساکارید در میسلیوم این قارچ بود که با نتایج حاصل از تحقیقات در این مطالعه مطابقت دارد (٤٠).

مقاومت جدایه‌ها به نمک‌های صفراوی مورد بررسی قرار گرفت. رشد کمتر سویه‌ها با نمک‌های صفراوی بر اساس پیشنهاد ارائه شده توسط Chateau و Guo همکاران (١٩٩٤) و همکاران (٢٠٠٩) که گروه‌های متمایز را براساس تأخیر رشد و عدم رشد ایجاد شده به وسیله نمک‌های صفراوی تشخیص داده بودند، تحلیل گردیدند (٤١). جدایه‌های مطالعه حاضر در حضور نمک‌های صفراوی رشد کمتری داشتند. یافته‌ها در آزمون جدایه‌های انتخاب شده نسبت به نمک‌های صفراوی با یافته‌های موجود در مطالعات قبلی مطابقت داشت. در مورد سویه‌های آزمون، رشد کمتر جدایه‌ها با نمک‌های صفراوی نسبت به کشت کنترل مشهود بود.

محمودی در سال ١٣٩٦ در مطالعه‌ای الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی-پروبیوتیکی را نشان داد. او بیان نمود حدود ٥١ درصد باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول مقاوم بودند. موثرترین آنتی‌بیوتیک، سیپروفلوکساسین با حساسیت ٨٢ درصد بود. لاکتوباسیل‌ها به غلظت بالای ونکومایسین مقاوم هستند. همه‌ی گونه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک به سولفونامیدها و تریستوپریم و اکثر آن‌ها به مترونیدازول مقاوم‌اند. *لاکتوباسیلوس* جانسونی نیز دارای ژن درون کروموزومی مقاوم به اریترومایسین است. در مطالعه محمودی سویه‌های لاکتوباسیل نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، کلیندامایسین و کلرامفنیکل حساس و نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نیمه‌حساس بودند. سویه‌های مخمر به فلوکونازول مقاوم، به کتوکونازول حساس و به آمفوتریپسین B نیمه حساس بودند. علت مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری ریزپوشانی شده، می‌تواند ناشی از لایه ریزپوشانی‌ای که دور باکتری را گرفته باشد که باعث عدم تشکیل هاله می‌شود. یافته‌های این پژوهش همسو با مطالعات اخیر است که نشان داده‌اند باکتریوسین‌های تولیدی *لاکتوباسیلوس‌ها* می‌توانند نقش مؤثری در مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا داشته باشند و حتی موجب افزایش حساسیت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها شوند (٤٢و٤٣).

برای شناسایی دقیق‌تر در این پژوهش از روش‌های مولکولی استفاده شد که قدرتمندترین و صحیح‌ترین روش، توالی‌یابی است. از بین ژن‌های مربوط به پروکاریوت‌ها، ژن ١٦S rRNA اغلب به‌عنوان یک ژن هدف در اکثر مطالعات تنوع باکتریایی و ١٨ S rRNA در اکثر مطالعات تنوع مخمری مطرح می‌باشد. نتایج الکتروفورز DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز وجود کیفیت خوب DNAs جهت استفاده در واکنش زنجیره‌های پلیمرازی تأیید نمود. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر ژن، آشکارسازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل الکتروفورز انجام شد.

در این مطالعه تغییرات مقدار مواد جامد محلول محاسبه شده در آبمیوه‌ی صنعتی پروبیوتیک در مدت ٦٠ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس انجام شد. نتایج که اثر تیمار و زمان و اثر متقابل تیمار و زمان بر میزان مواد جامد محلول معنی‌دار بود ($p \leq ٠/٠٥$). در مقایسه، تیمارهای انکپسوله شده نسبت به تیمارهای آزاد افزایش معنی‌داری داشت. مقدار مواد جامد محلول در آبمیوه صنعتی سیب انکپسوله شده با باکتری (B1C) در پایان دوره نگهداری بریکس آبمیوه به ١٣ افزایش یافت. مقدار مواد جامد محلول در آبمیوه‌ی صنعتی سیب انکپسوله شده با مخمر (Y8C) در پایان دوره نگهداری بریکس آبمیوه به ١٢/٧ افزایش یافت. علت افزایش مقدار مواد جامد محلول در نوشیدنی می‌تواند وجود ترکیبات قندی در این پروبیوتیک باشد.

در این تحقیق تغییرات اسیدیته اندازه گیری شده در آبمیوه صنعتی در مدت ٦٠ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس

انجام شد. مشاهده شد که در آبمیوه صنعتی سیب تمامی تیمارهای حاوی باکتری و مخمر آزاد و انکپسوله شده با گذشت زمان اسیدیته کاهش یافت ($p \leq ۰/۰۵$). همچنین نتایج نشان داد که بالاترین کاهش اسیدیته در تیمار حاوی باکتری (B1) و مخمر (Y8) به صورت آزاد از ٤/١٦ به ٣/٨٦ پس از نگهداری طی ٦٠ روز و همچنین بیشترین کاهش اسیدیته در تیمارهای انکپسوله مربوط به تیمار Y8C که از ٤/١ به ٣/٨٥ پس از نگهداری طی ٦٠ روز در دمای ٤ درجه سلسیوس می‌باشد. دلیل کاهش اسیدیته در آبمیوه‌ها می‌تواند ناشی از تولید اسید باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد ماندگاری ویژگی‌های حسی آبمیوه سیب با استفاده از باکتری، آلژینات سدیم و پلی‌ساکارید و مخمرریزپوشانی شده نسبت به باکتری و مخمر آزاد بعد از گذشت ٦٠ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس 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 دلبروکی* سویه *٤٠٤٠*، آلژینات سدیم و پلی‌ساکارید های *گانودرما لوسیدوم* در آبمیوه سیب داشت.

مقدار اسیدیته از مسائل مهم در تولید یک فرآورده پروبیوتیکی است زیرا اسیدیته در مدت زمان نگهداری محصول کاهش می‌یابد که نشان دهنده رشد پروبیوتیک می باشد. تغییرات سایر فاکتورهای اندازه‌گیری شده از قبیل کاهش بریکس و افزایش اسیدیته، تایید کننده تکثیر و فعالیت پروبیوتیک با محتوای قندی بالا است. در این تحقیق مشخص شد که انکپسولاسیون همزمان باکتری‌ها و مخمرهای پروبیوتیک به همراه آلژینات که ماده‌ای با ماهیت غیر مضر بوده و با قیمت نسبتا ارزان در دسترس است، باعث افزایش زنده‌مانی آن‌ها درمحصولات غذایی می‌شود. علاوه بر این استفاده از قارچ گانودرما باعث تقویت و حفظ عملکرد بهتر میکروارگانیسم‌ها شده و دومین لایه پوششی اطراف میکروب را ایجاد کند. از آنجا که عصاره میوه‌ها حاوی مواد سودمند مانند مواد معدنی، آنتی اکسیدان‌ها، فیبرهای رژیمی و ویتامین‌ها بوده و نیز فاقد مواد حساسیت‌زای موجود در شیر هستند، می‌توانند محیط مناسبی برای تولید نوشیدنی‌های غیرلبنی پروبیوتیک که انتخاب ارجح مصرف‌کنندگان در تمامی سنین می‌باشد به شمار آیند. از این رو آبمیوه سین‌بیوتیک را می‌توان به عنوان یک محصول جدید به صنعت عرضه نمود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری و حمایت‌های صمیمانه آزمایشگاه میکروبیولوژی و تیم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله تمامی اصول اخلاقی پژوهش از جمله رعایت حقوق انسانی و حیوانی، عدم سرقت علمی، عدم جعل و تحریف داده‌ها و رعایت امانت‌داری علمی را به طور کامل رعایت کرده‌اند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در ارتباط با این پژوهش وجود ندارد.

References

1. Iqbal A, Irshad S, Saeed S, et al. Probiotic potential of encapsulated Lactobacillus species in yogurt formation indigenously isolated from dairy source. Advancements in Life Sciences 2021; 8:267-274.
2. Alemzadeh I, Afarin M, Dehghan A, et al. Clinical uses and survival study of free and encapsulated probiotic bacteria in fruit juices: a review. Applied Food Biotechnology 2021; 8: 161-180.
3. Unban K, Chaichana W, Baipong S, et al. Probiotic and antioxidant properties of lactic acid bacteria isolated from indigenous fermented tea leaves (Miang) of north Thailand and promising application in synbiotic formulation. Fermentation 2021; 7: 195.
4. Vazifedoost M. Evaluation of survival of probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* (La-5) microencapsulated in synbiotic ketchup sauce and simulated gastric and intestinal environment. Journal of Food Microbiology 2021; 8: 64-75.
5. Larypoor M, Karbalaeiheidar H, Basiji K, et al. An overview of the use of probiotics and their metabolites in the treatment of diseases. Biotechnological Journal of Environmental Microbiology 2023; 7: -. DOI: 10.71886/bioem.2023.1190519.
6. Perez-Montes A, Rangel-Vargas E, Lorenzo JM, et al. Edible mushrooms as a novel trend in the development of healthier meat products. Current Opinion in Food Science 2021; 37: 118-124.
7. Wang X-M, Yang M, Guan S-H, et al. Quantitative determination of six major triterpenoids in Ganoderma lucidum and related species by high performance liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis 2006; 41: 838-844.
8. Boh B, Berovic M, Zhang J, et al. Ganoderma lucidum and its pharmaceutically active compounds. Biotechnology annual review 2007; 13: 265-301.
9. Staniszewski A and Kordowska-Wiater M. Probiotic and potentially probiotic yeasts—Characteristics and food application. Foods 2021; 10: 1306.
10. Pato U, Ayu DF, Riftyan E, et al. Cellulose microfiber encapsulated probiotic: Viability, acid and bile tolerance during storage at different temperature. Emerg Sci J 2022; 6: 106-117.
11. Chung Y-C, Jin H-M, Cui Y, et al. Fermented milk of *Lactobacillus helveticus* IDCC3801 improves cognitive functioning during cognitive fatigue tests in healthy older adults. Journal of functional foods 2014; 10: 465-474.
12. Maciel MIS and de Souza MMB. Prebiotics and Probiotics-Potential Benefits in Human Nutrition and Health. Prebiotics and Probiotics-Potential Benefits in Nutrition and Health 2020.
13. Frakolaki G, Giannou V, Kekos D, et al. A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. Critical reviews in food science and nutrition 2021; 61: 1515-1536.

14.Rodrigues F, Cedran M, Bicas J, et al. Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications–A narrative review. Food Research International 2020; 137: 109682.

15.Sarao LK and Arora M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. Critical reviews in food science and nutrition 2017; 57: 344-371.

16.Hasani M, Rad AE, Hosseini MM, et al. Physicochemical characteristic of microencapsulated fish oil by freeze-drying using different combinations of wall materials. Biosci Biotechnol Res Asia 2015; 12: 45-51.

17.Oberoi K, Tolun A, Sharma K, et al. Microencapsulation: An overview for the survival of probiotic bacteria. The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 2019; 9: 280.

18.Sanders ME, Goh YJ and Klaenhammer TR. Probiotics and prebiotics. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers 2019.854-831 :

19.Kwiecień I and Kwiecień M. Application of polysaccharide-based hydrogels as probiotic delivery systems. Gels 2018; 4: 47.

20.Martău GA, Mihai M and Vodnar DC. The use of chitosan, alginate, and pectin in the biomedical and food sector—biocompatibility, bioadhesiveness, and biodegradability. Polymers 2019; 11: 1837.

21.Liliana S, Vladimir V, Serna-Cock L, et al. Probiotic encapsulation. Afr J Microbiol Res 2013; 7: 4743-4753.

22.Goh CH, Heng PWS and Chan LW. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. Carbohydrate Polymers 2012; 88: 1-12.

23.Agüero L, Zaldivar-Silva D, Peña L, et al. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. Carbohydrate polymers 2017; 168: 32-43.

24.Aspri M, Papademas P and Tsaltas D. Review on non-dairy probiotics and their use in non-dairy based products. Fermentation 2020; 6: 30.

25.Di Cagno R, Coda R, De Angelis M, et al. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation .Food microbiology 2013; 33: 1-10.

26.Xiao M, Xiong T, Peng Z, et al. Correlation between microbiota and flavours in fermentation of Chinese Sichuan Paocai. Food Research International 2018; 114: 123-132.

27.Hadi Chegeni A, Hadi F, Kowsari M, et al. Antifungal activity of native bacteria isolated from Khorramabad agricultural soil. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 2019; 26: 383-391.

28.Nasiri PS, Larypoor M, Fazeli MR, et al. Study of probiotic potential of yeasts isolated from dairy products, sourdough, and fruit peel. 2022: 69-87.

29.Lotfi M. Isolation, identification and optimization of alkaline protease production by *Candida viswanathii*. Iranian Journal of Medical Microbiology 2014; 7: 36-42.

30.Nielsen SS. Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates. Food analysis laboratory manual 2010: 47-53.

31.Abolghasemi H, Larypoor M and Hosseini F. Probiotic effects of Metschnikowia isolated from dairy products aquatic environments. International Journal of Molecular and Clinical Microbiology 2022; 12: 1692-1703.

32.Cook A and Stall R. Necrosis in leaves induced by volatile materials produced in vitro by bacteria. 1969.

33.Ren G, Xu L, Lu T, et al. Structural characterization and antiviral activity of lentinan from Lentinus edodes mycelia against infectious hematopoietic necrosis virus. International journal of biological macromolecules 2018; 115: 1202-1210.

34.Mohammadi Afshar MR, Larypoor M and Hosseini F. Isolation, identification and encapsulation of microbes isolated from effluent of dairy factories by alginate and polysaccharides of Lentinula edodes. Journal of Microbial Biology 2024; 13: 97-128.

35.Min M, Bunt CR, Mason SL, et al. Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. Critical reviews in food science and nutrition 2019; 59: 2626-2641.

36.Nourbakhsh F, Hosseini Z and Safaeijavan R. Investigation of the effect of zinc oxide nanoparticles and *Lactobacillus plantarum* biosurfactant on biofilm formation of pathogenic bacteria. World of Microbes 2025; 60.- :

37.Jin X, Beguerie JR, Sze DMy, et al. Ganoderma lucidum (Reishi mushroom) for cancer treatment. Cochrane Database of Systematic Reviews 2012.

38.Mirmazloum I, Ladányi M, Omran M, et al. Co-encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and Reishi medicinal mushroom (Ganoderma lingzhi) extract in moist calcium alginate beads. International Journal of Biological Macromolecules 2021; 192: 461-470.

39.Conway P, Gorbach S and Goldin B. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. Journal of dairy science 1987; 70: 1-12.

40.Lee KY and Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. Progress in polymer science 2012; 37: 106-126.

41.Chateau N, Deschamps A and Sassi AH. Heterogeneity of bile salts resistance in the Lactobacillus isolates of a probiotic consortium. Letters in Applied Microbiology 1994; 18: 42-44.

42.Abdizadeh S, Mahmoudi MM and Javanmardi F. Investigation of the antibacterial properties of bacteriocin produced by Lactobacillus genus and study of its possible synergistic effects with some common antibiotics. World of Microbes 2025; 60.- :

43.Alhasinat LAA, Behboodian B, Dolatabadi S, et al. Isolation, identification and investigation of the relationship between multidrug resistance (MDR) and the presence of mexC, exoS and plcH genes in *P. aeruginosa* clinical isolates. Journal of Microbial World 2024