NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.12/48 , 2022

Scan online to view this article

Isolation of *Lactobacillus spp* from cheese and their microencapsulation to increase shelf life

Raziyeh Darbahaniha[1], Abbas Akhavan Sepahi[1], Sedigheh Mehrabiyan[1], AliReza Dehnad[*2]

1. Microbiology, Faculty of biological Sciences, Islamic Azad University of North Tehran.Tehran. Iran.

2. Microbiology and Biotechnology Department, East Azerbaijan Research and Education Center Agricultural and Natural Resources Department of Livestock Bacterial Diseases Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute , AREEO, Tabriz- IRAN.

Abstract

Aim and Background: Probiotics are a solution of living microorganisms and if are administered in adequate quantities, will be beneficial to the host's health**.** Probiotics have positive effects on the gastrointestinal tract; hence, these microorganisms must be resistant to the process of producing and storage in order to survive in the commercial product at the completion of their useful life, higher than the threshold of 10^6 CFU / g**.** We have examined several ways in order to increase the stability and activity of probiotics in commercial products: Selecting species resistant to acid and bile acids, compatibility to stress, and absorbing micronutrients. Microencapsulation.

Materials and Methods: in this case, Probiotic cultures were isolated from different randomly cheese samples. the using garam stain and biochemichal test and Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, we isolated probiotic lactobacilli. then we microencapsulated them.to reach a high density and high concentration network of low-fat milk solution as a gel forming solution.

Results: Based on past internal and external research, we witnessed successful microencapsulation. In this research, we could produce spherical capsules and moreover saw very high microcapsulation effectiveness about 100%. we applied the special characteristics of milk and capsules produced in this approach gives very high characteristics to the product.

Conclusion: insoluble microcapsules in water with milk protein can be a very good alternative to encapsulation of probiotics from herbal gels by ionotropic or polysaccharides like alginate. In addition to the considerable functional features of milk protein, it can also be efficient to decrease the size of capsules, as the size of capsules produced due to sensory taste features is very significant not to touch under the tongue.

Key word: microcapsulation. Hologenome. Probiotic bacteria. *Lactobacilli,* Iau Science.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.8.7]

Corresponding author:

Microbiology and Biotechnology Department, East Azerbaijan Research and Education Center Agricultural and Natural Resources Department of Livestock Bacterial Diseases Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute , AREEO, Tabriz- IRAN.

Email: a.dehnad@areeo.ac.ir

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۲ - شماره۴۸ - پاییز۱۴۰۱
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

جداسازی لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک از پنیر سنتی و میکروکپسولاسیون آن‌ها جهت افزایش ماندگاری

راضیه دربهانیها[۱]. عباس اخوان سپهی[۱]. صدیقه مهرابیان[۱]. علیرضا دهناد[۲*]

۱. گروه زیست شناسی. دانشکده علوم زیستی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. تهران. ایران.

۲. گروه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، بخش تحقیقات بیماری‌های باکتریایی دام مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، تبریز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: پروبیوتیک‌ها مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌های زنده بوده و هنگامی‌که به مقدار کافی تجویز شود برای سلامتی میزبان مفید هستند. به‌منظور حفظ اثر مثبت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک - در دستگاه گوارش تعداد این میکروارگانیسم‌ها باید در طی فرآیند تولید و ذخیره‌سازی و به‌منظور زنده ماندن و حفظ در محصول نهایی تا پایان عمر مفید آن، بیش از آستانه ۱۰۶ CFU/g باشد.

چندین راه برای افزایش پایداری و فعالیت پروبیوتیک‌ها در محصولات تجاری مورد بررسی قرار گرفته است مانند: انتخاب گونه‌های مقاوم‌به اسید و اسیدهای صفراوی، سازگاری با استرس‌ها، و جذب ریزمغذی‌ها. میکروکپسولاسیون. در این مطالعه ما با استفاده از روش میکروکپسولاسیون به‌دنبال افزایش بقای میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک هستیم.

مواد و روش‌ها: در این مقاله بعد از خالص سازی و جداسازی کلنی‌ها از نمونه پنیر، با استفاده از کشت نمونه و سپس رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی گونه‌های پروبیوتیکی شناسایی و در نهایت جهت تعیین هویت‌شان با استفاده از Bergey's Manual of Determinative Bacteriology و هولوژنوم آن‌هایی که بیش‌ترین شباهت خصوصیات لاکتوباسیلی را داشته‌اند جداسازی و با پروتئین شیر میکروکپسوله شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه پس از جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک از پنیرهای سنتی، میکرو کپسول‌های کروی تولید شد که بازده میکروکپسوله کردن باکتری‌های پروبیوتیک با تکنیک کشت سطحی بسیار بالا و در حدود ۱۰۰ درصدی بوده است.

نتیجه‌گیری: میکروکپسول‌های پروبیوتیکی با سایز مناسب تولید شد. با توجه‌به سایز کوچک میکروکپسول‌ها و عدم تأثیر منفی بر حس چشایی می‌توان از آن‌ها در صنایع دارویی و صنایع غذایی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: میکروکپسولاسیون. هلوژنوم. باکتری‌های پروبیوتیک. *لاکتوباسیل*، Iau Science.

مقدمه

واژه پروبیوتیک از واژه یونانی پروبیوس به معنای حیات بخش یا زیست بخش یا زیست یار اقتباس شده است و از نظر مفهوم در مقابل واژه پادزیست (آنتی‌بیوتیک) به معنای ضدحیات قرار دارد (۱). پروبیوتیک‌ها مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌های زنده بوده و هنگامی‌که به مقدار کافی تجویز شود برای سلامتی میزبان مفید هستند (۲).

نویسنده مسئول:
گروه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، تبریز، ایران.
پست الکترونیکی: a.dehnad@areeo.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۰

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.8.7]

به‌طور اصولی در صنایع غذایی به غذایی پروبیوتیک گفته می‌شود که حاوی میکروارگانیسم‌هایی با ویژگی‌های زیر باشد:

۱. میکروارگانیسم‌های استقاده شده در آن در دسته پروبیوتیک‌ها طبقه‌بندی شده باشند.

۲. به‌صورت زنده و فعال به تعداد کافی به روده برسند.

۳. نسبت به اسید معده و نمک‌های صفراوی در روده کوچک مقاوم باشند.

۴. توانایی اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده و رقابت با پاتوژن‌ها را داشته باشند.

۵. توانایی تولید ترکیبات ضد باکتری‌های مضر مثل تولید اسیدلاکتیک، باکتریوسین و غیره را داشته باشند (۱).

برخی از اثرات مفید پروبیوتیک‌ها شامل موارد زیر هستند:

۱. جلوگیری از رشد و فعالیت پاتوژن‌ها

۲. کاهش کلسترول خون

۳. کاهش مشکلات مربوط به عدم تحمل لاکتوز

۴. جلوگیری از بیماری‌های روده‌ای و سرطان

۵. تأثیر بر عفونت‌های روده‌ای

۶. تأثیر بر عفونت‌های ادراری-تناسلی

۷. افزایش قدرت پاسخ‌گویی دستگاه ایمنی به تحریکات خارجی

۸. تولید ریزمغذی‌ها(۱).

به‌منظور اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش این میکروارگانیسم‌ها باید در برابر فرآیند تولید و ذخیره سازی به منظور زنده ماندن در محصول تجاری در پایان عمر مفید، بیش از آستانه $۱۰^{۶}$CFU/g (۱) باشند. در ضمن، باید به شرایط فیزیکی شیمیایی سخت در دستگاه گوارش مانند اسید معده و ترشحات صفراوی مقاوم بوده و در رقابت با میکرو بیوتای روده موفق باشند (۲).

چندین راه برای افزایش پایداری و فعالیت پروبیوتیک‌ها در محصولات تجاری مورد بررسی قرار گرفته است:

- انتخاب گونه‌های مقاوم‌به اسید و اسیدهای صفراوی، سازگاری با استرس‌ها، و جذب ریزمغذی‌ها (۳).
- میکروکپسولاسیون (۴).
- هم‌چنین یک ترکیب از دو رویکرد متفاوت می‌تواند یک راه حل قابل اجرا باشد.

میکروکپسولاسیون

کپسوله کردن اغلب به‌عنوان یک راه برای محافظت باکتری‌ها در برابر فاکتورهای زیست محیطی شدید ذکر شده است (۵). هدف از کپسوله کردن ایجاد یک محیط زیست کوچک که در آن باکتری‌ها در طول فرآیند ذخیره‌سازی و مصرف زنده مانده و در جایگاه‌های مناسب در دستگاه گوارش به‌عنوان مثال: روده کوچک آزاد شوند (۳). کپسوله کردن اشاره به یک فرآیند فیزیکی و یا مکانیکی به دام انداختن یک ماده در یک ماده دیگر به‌منظور تولید ذرات با قطر چند نانومتر تا چند میلی‌متر را دارد. بنابراین کپسول، ذرات کوچک حاوی ماده فعال و یا مواد هسته احاطه شده توسط یک پوشش یا پوسته است. مواد مورد استفاده در میکروکپسولاسیون براساس نوع ماده‌ای که میکروکپسوله خواهد شد می‌تواند شامل اتواع پلی‌مرها، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها باشد. حفاظت از مواد فعال زیستی، به‌عنوان مثال ویتامین‌ها – آنتی‌اکسیدان‌ها ـ پروتئین‌ها – لیپیدها ممکن است با استفاده از فن‌آوری های متعدد کپسوله کردن، برای تولید غذاهای عملکردی با افزایش عملکرد و ثبات و پایداری صورت می‌گیرد.

روش‌های عمده و اصلی برای میکروکپسوله کردن شامل اسپری خشک کن، اسپری خنک کننده، لیوفلیزاسیون، امولسیون، اکستروژن، چسبندگی به دانه‌های نشاسته و پوشش‌های فشرده سازی است (۶).

حامل یا پوشش برای میکروانکپسوله کردن میکروکپسول‌ها باید برای حفظ ساختار اصلی خود در ماتریکس مواد غذایی و در دستگاه گوارش، نامحلول در آب باشند. مواد به تنهایی و یا به‌صورت ترکیب با شکل تک لایه استفاده می‌شوند. پوشش میکروکپسول با دو غشاء می‌تواند از قرار گرفتن در معرض اکسیژن در طول ذخیره‌سازی، جلوگیری کند و هم‌چنین می‌تواند مقاومت سلول را در شرایط اسیدی و غلظت بالای نمک صفراوی افزایش دهد. از انواع حامل‌های میکروکپسول‌ها می‌توان به آلژینات، کیتوزان، صمغ ژلاتینه (ژلان)، زانتان، کاراژینان، پکتین، ژلاتین، ژل پروتئین شیر، پروتئین آب پنیر، نشاسته، سلولز استات فتالات، سدیم کربوکسی متیل سلولز اشاره کرد (۱۰).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.8.7]

امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها در صنایع دارویی و غذایی مورد توجه بسیار قرار گرفته‌است. باتوجه‌به اهمیت میزان ورود باکتری زنده در تأثیرگذاری بیش‌تر آن، در این مطالعه به‌منظور افزایش ماندگاری باکتری‌های پروبیوتیک جداسازی شده از پروتئین شیر با توجه خصوصیات مناسب این ماده و هم‌چنین زیست سازگار بودن آن جهت میکروکپسولاسیون لاکتوباسیل‌ها استفاده شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مقاله تعدادی از باکتری‌های اسید لاکتیک از ۴ نمونه پنیرهای سنتی گوسفندی از منطقه دشت مغان (بیست کیلومتری اصلاندوز) و مشگین شهر (منطقه سبلان) واقع در استان اردبیل که بعد شناسایی بیوشیمیایی، پروبیوتیک بودن‌شان به اثبات رسیده بود جداسازی شد و از بین این ۹ نمونه ایزوله شده در نهایت یک نمونه جهت شناسایی به توالی‌یابی و هولوژنوم ارسال گردید. نمونه‌های جداسازی شده از A تا C نامگذاری شدند.

ابتدا محیط کشت جهت باکتری‌های لاکتوباسیلوس [de Man Rogosa and Sharpe (MRS)] که محیطی اختصاصی برای رشد و جداسازی باکتری‌های مورد نظر محسوب می‌شود و قادر است نیازهای غذایی پیچیده آن را فراهم سازد طبق دستورالعمل شرکت سازنده این محیط (شرکت بیولایف ایتالیا و شارلو اسپانیا) به‌صورت جامد (MRS agar) و مایع (MRS broth) تهیه شد.

هضم پنیر در سیترات سدیم

به‌منظور آنالیز میکروبی ۵ گرم نمونه تحت شرایط استریل به ۴۵ میلی‌لیتر محلول استریل سیترات سدیم ۲٪ (وزنی- حجمی) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به‌داخل فالکون اضافه شد و به‌مدت ۱ دقیقه توسط دستگاه شیگر هموژن گردید. توسط سمپلر از سوسپانسیون تهیه شده به‌صورت جداگانه به ۲۰ میلی‌لیتر محیط MRS broth انتقال یافت و در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید تا باکتری‌ها به حداکثر مقدار خود رسیدند. تمامی این مراحل در زیر هود و شرایط استریل انجام شد.

غربال جمعیت باکتریایی و انتخاب سویه‌های مقاوم‌به اسید

جهت انتخاب سویه‌های مقاوم‌به اسید، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت در مرحله قبل را سانتریفیوژ (۱۰۰۰ دور به‌مدت ۱۵ دقیقه) کرده و به میکروب‌های ته نشین شده ۲۰ میلی‌لیتر محلول بافر نمک فسفات اسیدی PBS (pH= ۲/۵) اضافه شد. پس از دو ساعت انکوباسیون در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سوسپانسیون به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ، سلول‌ها از محلول جدا شدند. پس از ۲ بار شستشو و سانتریفیوژ رسوب با بافر نمک فسفات خنثی (pH=۷/۵)، سلول‌ها به محیط MRS agar منتقل و ۷۲ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شدند. کلنی‌های رشد کرده روی محیط MRS agar پس از ۳ تا ۴ بار کشت خطی خالص شدند. سپس نمونه‌های خالص‌سازی شده از نظر واکنش گرم مثبت و تست کاتالاز بررسی شدند.

در نهایت جدایه‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی جداسازی شده داخل ویال‌ها حاوی محیط MRS broth و ۲۰٪ گلیسرول در فریزر جهت نگهداری منجمد شدند.

مقاومت‌به نمک‌های صفراوی

محیط کشت MRS مایع به‌عنوان کنترل و MRS مایع دارای ۰/۳ درصد املاح صفراوی (شرکت Merck آلمان) به‌عنوان کشت مورد آزمایش (تیمار) به‌طور هم‌زمان با یک درصد از کشت باکتریایی فعال ۲۴ ساعته تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۷ ساعت انکوبه شدند. منحنی‌های رشد بر اساس جذب نوری برای هر ایزوله رسم و بر اساس اختلاف در جذب‌های نوری متوالی بین کشت‌های کنترل و تیمار به‌عنوان تأخیر در رشد در نتیجهٔ اثر بازدارندگی نمک‌های صفراوی در نظر گرفته شد.

آزمایشات مولکولی

یکی از نمونه‌های ایزوله شده از دشت مغان (نمونه B2) جهت توالی‌یابی به جهاد دانشگاهی تهران ارسال شد و جهت تکثیر این قطعه ژنی از پرایمرهای اختصاصی f ۲۷ و ۱۴۹۲ استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با مرحله دناتوراسیون اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در ^{o}C ۹۴ آغاز گردید و با انجام ۳۵ سیکل متوالی (^{o}C ۹۴به‌مدت ۱۵ ثانیه، ^{o}C ۶۰ مدت ۱۵ ثانیه، ^{o}C ۷۲ به‌مدت ۱ دقیقه) و در پایان ^{o}C ۷۲ به‌مدت ۱۰ دقیقه به اتمام رسید. پس از آن به‌منظور شناسایی باکتری مورد نظر در سطح گونه فرآورده‌های حاصل الکتروفورز گردیدند (۱۱).

آنالیز بیوانفورماتیکی با نرم‌افزارهای Mega6 و دیتابیس‌های NCBI و EzBioCloud's انجام شده است. جدول

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.8.7]

نتایج بر اساس داده‌های حاصل از (eztaxon) EzBioCloud's است. توالی‌یابی سانگر در شرکت microsynth سوییس انجام گرفته است.

شرایط و مواد PCR:

Bacterial 16s rRNA gene amplified.
Primers:
16s- 27F: 5' –
TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTC- 3'
16s-1492R: 5'-
AGGAGGTGATCCAACCGCA – 3'

PCR conditions:

۵ min	۹۴°C	
۱ min	۹۴°C	
(cycle)۳۵	۴۰ sec	۶۰°C
۹۰sec	۷۲°C	
(۱ cycle)	۱۰min	۷۲°C

PCR reaction:

Template DNA:	100 ng
PCR 10X buffer :	5 µl
Mgcl2:	3 µl
dNTPs:	1 µl
forward primer:	0.5 µl
reverse primer:	0.5 µl
Taq DNA polymerase:	0.5 µl
Water:	up to 50 µl

میکروانکپسولاسیون لاکتوباسیل‌های جداسازی شده

کشتی از باکتری‌های پروبیوتیک جداسازی شده در محیط کشت MRS براث تهیه و سپس این سوسپانسیون سانتریفیوژ شده و رسوب باکتریایی جداسازی شده ۳ بار با PBS استریل در pH ۷ شسته شده و در همان بافر به غلظت 10^9 cfu/ml رسیدند. ۳۰ میلی‌لیتر مخلوط ۲ میلی‌لیتر سلول (10^9cfu/ml) و ۲۸ میلی‌لیتر شیر سرد (۳۵ درصد وزنی- وزنی با آب دوبار تقطیر) در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد با ۴۰۰ میکرولیتر محلول استوک تهیه شده از رنت مخلوط شد و به‌مدت ۶۰ دقیقه نگه‌داری گردید. سپس ۱۸۰ میکرولیتر از محلول کلرید کلسیم ۱۰ درصد (وزنی- وزنی) به مخلوط فوق اضافه شد و بلافاصله ۱۵ میلی‌لیتر از مخلوط به ۱۵۰ میلی‌لیتر روغن مایع گیاهی در یک ارلن مایر ml ۲۰۰ در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد اضافه شد و روی یک هم‌زن مغناطیسی قوی با ۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد تا فرآیند امولسیونی آغاز شود. سپس دما به ۴۰ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد و بعد از آن با کاهش دما تا حدود ۱۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد بلافاصله قطرات امولسیونی به ذرات ژل تبدیل شدند. در این مرحله میکروکپسول‌های ژلاتینه شده با سانتریفیوژ با دور ملایم ۵۰۰ دور در دقیقه از روغن جداسازی و مایع رویی حذف و رسوب مجدد با دو برابر حجم آن از آب دو بار تقطیر رقیق گردید و تحت همان شرایط دو بار سانتریفیوژ شد تا روغن آن کامل حذف گردد. سپس مشاهده میکروکپسول‌های تولید شده با میکروسکوپ نوری جهت تأیید انجام فرآیند و مشاهده سایز تقریبی آن‌ها صورت گرفت.

شمارش باکتری‌های به‌دام افتاده در کپسول‌ها

کپسول‌های تهیه شده در محلول ۱ درصد w/v از سیترات سدیم استریل با pH حدود ۶ پراکنده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق هم‌زده شد تا کپسول‌ها به‌طور کامل حل و باکتری‌ها آزاد شوند، آنگاه رقت‌های سریال با ۱۰ برابر رقت تهیه و ۱ میلی‌لیتر ازهر نمونه در MRS آگار به‌صورت پور پلیت کشت داده شدند آنگاه واحد تشکیل کلنی CFU پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط بی‌هوازی مشخص شد. داده‌های حاصل با تعداد اولیه سلول‌های به‌کار رفته در میکروکپسولاسیون مقایسه گردید و درصد یا بازده فرآیند به‌دست آمد.

یافته‌ها

در این مقاله پس از خالص‌سازی و جداسازی کلنی‌ها، با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی باسیل‌های گرام مثبت، کاتالاز منفی، اکسیداز منفی و فاقد حرکت و احیای نیترات شناسایی شدند و در جمع‌بندی جهت تعیین هویت‌شان با استفاده از Bergey's Manual of Determinative Bacteriology، آن‌هایی که از نظر خصوصیات لاکتوباسیلی بیش‌ترین شباهت را داشته‌اند مورد تعیین قرارگرفتند. در نهایت جنس‌های مناسب از نظر ویژگی‌های پروبیوتیکی یک مورد جداسازی و آزمایشات مولکولی بر روی آن انجام شد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

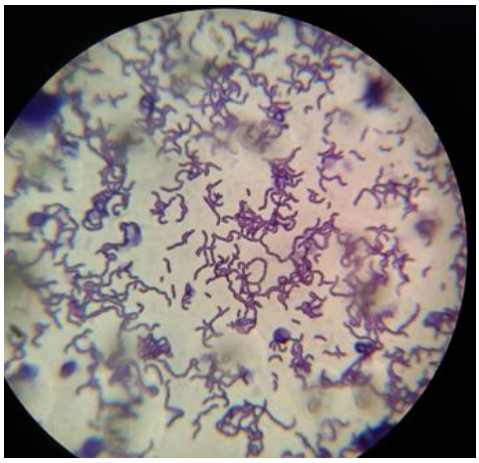
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.8.7]

رنگ‌آمیزی گرام

در رنگ‌آمیزی گرم، باکتری‌ها بر مبنای رنگ باکتری پس از رنگ‌آمیزی به دو دسته گرم مثبت و گرم منفی تقسیم می‌شوند. رنگ باکتری پس از رنگ‌آمیزی به توانایی حفظ رنگ اول و به‌عبارتی به ساختمان دیواره سلولی باکتری بستگی دارد. در رنگ‌آمیزی گرم باکتری‌های گرم مثبت پس از رنگ‌آمیزی به رنگ بنفش و باکتری‌های گرم منفی به رنگ قرمز مشاهده می‌شود. جنس لاکتوباسیلوس به‌صورت باسیل‌های گرم مثبت دراز استوانه‌ای که بعضی فرم‌های کوتاه باسیلی یا مارپیچی (کوکوباسیل‌های کورینه فرمی) به‌صورت عادی در زنجیره‌های کوتاه و یا به‌صورت منفرد دیده می‌شود.

تست‌های بیوشیمیایی

نتایج تست‌های بیوشیمیایی نمونه‌ها در جدول ۱ گزارش می‌شود.



شکل ۱. تصویری از رنگ‌آمیزی گرام لاکتوباسیل‌های جداسازی شده

جدول ۱. نتایج آنالیز بیوشیمیایی سویه‌های جداسازی شده

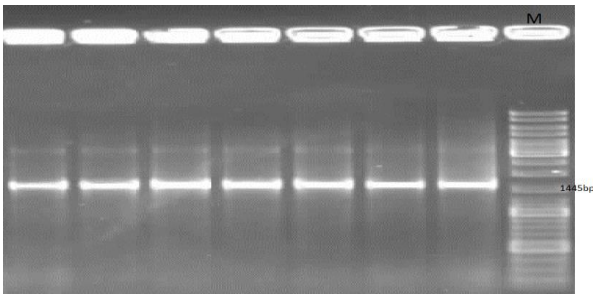
نام سویه	تخمیر گلوکز	تخمیر گالاکتوز	تخمیر فروکتوز	تخمیر لاکتوز	تخمیر مالتوز	تخمیر مانوز	تخمیر آرابینوز	تخمیر سوربیتول	تخمیر ساکارز	تولید گاز از گلوکز	احیاء نیترات	SIM	سیترات	اکسیداز	کاتالاز
A1	+	+	+	+	+	+	–	+	+	–	–	+,-,-	–	–	–
A2	+	+	+	+	+	–	+	+	–	–	–	+,-,-	–	–	–
A3	+	–	+	+	+	+	–	+	–	–	–	+,-,-	–	–	–
B2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+,-,-	–	–	–
B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+,-,-	–	–	–
C1	+	–	+	+	+	+	–	+	–	–	–	+,-,-	–	–	–
C2	+	+	+	+	+	+	–	+	–	–	–	+,-,-	–	–	–
C3	+	+	+	+	+	+	–	+	+	–	–	+,-,-	–	–	–
C4	+	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	+,-,-	–	–	–

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.8.7]

آزمایشات مولکولی

محصول PCR، ۵ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل اگارز ۱٪ لود و الکتروفورز انجام شده است.



شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR

جدول ۲. باکتری‌های ارسال شده برای توالی یابی

Name of sample	Length Bp	Max. identity	Top hit Strain	Identity %	Taxonomy
Tube sample	۱۴۵۵	***Lactobacillus plantarum subsp. Plantarum***	ATCC 14917(T)	۹۹/۸	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;*Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactobacillus*

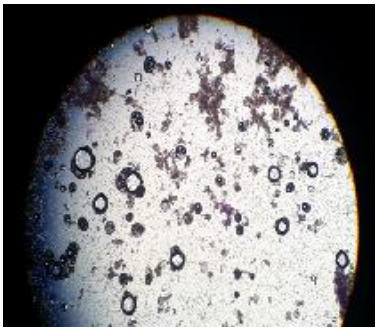
هولوژنوم

در ضمن هولوژنوم باکتری *Lactobacillus plantarum* به‌تازگی صورت گرفته است.

Lactobacillus plantarum subsp. plantarum ATCC 14917 =CGMCC 1.2437 strain ATCC 14917, whole genome shotgun sequence

مشاهده میکروسکوپی لاکتوباسیل‌های میکروکپسوله شده

باکتری‌های پروبیوتیک میکروکپسوله شده با استفاده از فن آوری ژل شدن آنزیمی و امولسیون با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ تحت میکروسکوپ نوری میکروکپسول‌ها بررسی شدند، شکل آن‌ها به‌طور کامل کروی است. برای بررسی اندازه دقیق کپسول‌ها استفاده از پراش اشعه ایکس با استفاده از کولتر امکان‌پذیر است.



شکل ۳.تصویر مشاهده میکروسکوپی لاکتوباسیل‌های میکروکپسوله

شمارش باکتری‌های به‌دام افتاده در کپسول‌ها

تعداد اولیه سلول‌های زنده قبل از فرآیند میکروکپسولاسیون در بار اول حدود log cfu /ml ۹/۰۲ – ۱۰ بود که این شمارش پس از فرآیند میکرو کپسوله کردن log cfu /ml ۹/۲ رسید. بار دوم از log cfu /ml ۱۰به log cfu /ml ۹/۸ رسید. تعداد کم از دست رفتن باکتری‌ها در مرحله کپسولاسیون نشانه دقت مناسب به‌کار رفته در این مرحله است به‌عبارت دیگر بر اساس نتایج، کپسولاسیون تأثیری در شمار باکتری‌ها نداشته است.

بحث

به‌تازگی پروبیوتیک‌ها توجه بسیار زیادی را به خود جلب کرده‌اند و تحقیقات بسیاری در جهت استفاده از روش‌هایی به‌منظور افزایش بازدهی و ماندگاری آن‌ها صورت گرفته است. اثر حفاظتی با توجه‌به میکروکپسوله کردن سلول‌های پروبیوتیک ایجاد یک مانع فیزیکی در مقابل شرایط نامطلوب خارجی نسبت داده می‌شود که آن‌را می‌توان با ساخت یک محیط میکرو کوچک محافظ با استفاده از به‌دام انداختن فیزیکی سلول‌های پروبیوتیک در یک ماتریکس متراکم پروتئین انجام داد.

میکروانکپسولاسیون‌های موفقی از مطالعات داخلی و خارجی در سال‌های اخیر گزارش شده است به‌عنوان مثال David Semyonov و همکارانش در سال ۲۰۱۰ با روش اسپری درایر سرد اقدام به میکروکپسولاسیون لاکتوباسیلوس‌ها کردند (۱۴). Haghshenas و همکارانش در سال ۲۰۱۵ میلادی موفق شدند باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیل پلنتاروم ۱۵ اچ ان را با استفاده از مخلوط پلی‌مری آلژینات-پیزلیوم-پانژورک میکروکپسوله کنند (۴). علاوه‌بر این Jantzen و همکارانش در سال ۲۰۱۳ میلادی موفق به تکثیر و میکروکپسولاسیون باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیل رئوتری و بررسی بقای مناسب این باکتری در طول انبارش شدند (۶). Liang-KunLiao و همکارانش در سال ۲۰۱۷ لاکتوباسیلوس کازئی LK-1 را با استفاده از روش اسپری درایر جهت افزایش پایداری آن میکروکپسوله کردند (۸). Gildas KomenanGbassi و همکارانش در سال ۲۰۰۹ باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم را در ماتریکس الژینات پوشش داده شده با پروتئین آب پنیر میکروکپسوله کردند (۶). Camila Eckert و همکارانش در سال ۲۰۱۷ میکروکپسولاسیون لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC 8014 را با استفاده از آب پنیر لبنی به‌عنوان مواد دیواره‌ای از طریق اسپری درایر انجام دادند (۱۵). Mohammadi و همکارانش در سال ۲۰۱۲ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را با آلژینات میکروکپسوله کرده و میزان بقای

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.8.7]

آن‌ها را در سس مایونز بررسی کردند (۱۸). Krasaekoopt و همکارانش در سال ۲۰۰۶ به بررسی میزان بقای پروبیوتیک-های میکروکپسوله با آلژینات پوشش داده شده با کیتوزان در ماست و شیر تصفیه شده در زمان انبارش پرداختند (۲۰).

برخی از محققین پژوهش‌هایی در بررسی اثر سیستم گوارشی بر میکروکپسول‌های تولید شده انجام داده اند مانند Hai-YanChen و همکارانش در سال ۲۰۱۷ باکتری لاکتوباسیلوس بولگاریکوس را میکروکپسوله کرده و میزان بقای آن را در شرایط شبیه‌سازی شده گوارشی سنجیدند (۷). Anderson و همکارانش در سال ۱۹۹۹ تأثیر ماست حاوی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس L1 را بر روی کلسترول انسان‌های با کلسترول بالا بررسی کردند که باعث کاهش میزان کلسترول آن‌ها شده بود (۱۶). هم‌چنین در سال ۲۰۱۷ MingfeiYao و همکارانش برای افزایش زنده ماندن ذخیره‌سازی و تحویل هدفمند باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس سالیواریوس Li01 به میکروبیوتای روده، این باکتری پروبیوتیک را میکروکپسوله کردند (۱۰). Favaro-Trindade و همکارانش در سال ۲۰۰۲ L acidophilus (La-05) و B. lactis (Bb-12) را میکروکپسوله کردند و سپس میزان زنده ماندن آن‌ها را در اسیدیته معده بررسی کردند (۱۷). Hansen و همکارانش در سال ۲۰۰۲ میزان بقای بیفیدیوباکتریوم میکروکپسوله شده با آلژینات کلسیم در شیر را در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش بررسی کردند (۱۹).

جهت میکروکپسیولاسیون از مواد مختلفی می‌توان استفاده کرد. برای مثال آلژینات، نشاسته، پروتئین شیر و... استفاده از آلژینات به آسانی جهت تشکیل ماتریکس ژل در اطراف سلول های باکتری برای بدن امن است. آن‌ها ارزان قیمت‌اند، شرایط فرآیند ملایم (معتدل) است (مانند دما) و به‌درستی در روده حل شده و سلول‌های به تله افتاده به آسانی آزاد می‌شوند. با این حال برخی از معایب به آلژینات نسبت داده شده است. برای مثال، میکروکپسول‌های آلژینات به محیط اسیدی حساس‌اند که مقاومت دانه در شرایط معده خوب نیست. دیگر نقطه ضعف میکروذرات آلژینات این است که دانه‌های میکرو و کوچک به‌دست آمده بسیار متخلخل بوده و حفاظت خوبی از سلول‌ها درمحیط زیست خود ندارند.

در این تحقیق جهت میکروکپسولاسیون از پروتئین شیر استفاده شد. مثل ژلاتین، پروتئین شیر قادر به تشکیل ژل در شرایط مناسب است. پروتئین‌ها شامل زنجیره‌ای از مولکول-های اسید آمینه متصل شده توسط پیوندهای پپتیدی هستند و انواع مختلفی از پروتئین‌ها به‌علت تعداد بالایی از اسیدهای آمینه (۲۲ واحد) و امکان ایجاد توالی‌های بسیار مختلفی وجود دارد که پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهند. در میان پروتئین‌های دیگر، پروتئین شیر برای کپسوله کردن مواد با توجه‌به خواص فیزیکی – شیمیایی آن‌ها بسیار جالب توجه است و می‌توان آن‌ها را به‌عنوان یک سیستم تحویل استفاده نمود (۱۲). برای مثال، پروتئین دارای خواص ژل شدن عالی است و این ویژگی یعنی کپسوله کردن سلول‌های پروبیوتیک به‌تازگی توسط Heidebach و همکاران مورد استفاده قرار گرفته است (۱۳). نتایج این مطالعات امیدوارکننده است و استفاده از پروتئین‌های شیر یک راه جالبی است زیرا از خود یک ویژگی زیست سازگاری خوبی دارند.

در این مطالعه ما توانسته‌ایم برای رسیدن به یک شبکه با تراکم بالا و بسیار متمرکز از محلول شیر کم چرب به‌عنوان محلول تشکیل ژل استفاده کنیم. با استفاده از این ماده توانستیم کپسول‌های کروی برای باکتری‌های پروبیوتیک تولید کنیم که بازده میکروکپسوله کردن بسیار بالا و در حدود ۱۰۰ درصدی را دارا باشند. خواص ویژه شیر و کپسول‌های تولید شده در این روش ویژگی‌های بسیار بالایی را به محصول می-دهد از آن جمله: کپسول‌ها در pH اسیدی بسیار مقاوم و در pH خنثی حدود ۶-۷ باز شده و محتویات خود را خالی می-کنند این ویژگی برای کپسول‌هایی که در تحویل دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند بسیار خوب و قابل توجه است. مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از واکنش ژل شدن آنزیمی یک استراتژی امیدوارکننده برای میکروانکپسوله کردن پروبیوتیک-ها است. هم‌چنین این مطالعه نشان داد میکروکپسول‌های نامحلول درآب با پروتئین شیر می‌تواند جایگزین بسیار مناسبی برای کپسوله کردن پروبیوتیک‌ها از ژل‌های گیاهی با روش یونوتروفیک یا پلی‌ساکاریدهایی مانند آلژینات باشد. علاوه‌بر این خواص عملکردی منحصر به‌فرد پروتئین شیر، می‌تواند در کاهش اندازه کپسول‌ها نیز مؤثر باشد چرا که اندازه کپسول‌های تولید شده از لحاظ ویژگی‌های حسی چشایی بسیار مهم است که زیر زبان لمس نگردد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از آن است که با توجه‌به اثر پروبیوتیکی باکتری جداسازی شده و میکروکپسولاسیون موفق آن، به‌دلیل سایز مناسب میکروکپسول‌ها و اثرات مفید این باکتری‌های پروبیوتیک بر سلامت انسان‌ها و حفاظت بهتر از پروبیوتیک‌ها تا رسیدن به روده و جذب بهتر در بدن، می‌توان از این میکروکپسول‌ها در صنایع دارویی به‌عنوان مکمل‌های روزانه و حامل‌های دارویی استفاده شود. هم‌چنین می‌توان امیدوار بود با توجه‌به سایز کوچک میکروکپسول‌ها و عدم تأثیر منفی آن‌ها در حس چشایی مصرف کننده گزینه مناسبی جهت استفاده از آن‌ها در صنایع غذایی مانند صنایع لبنی،

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.8.7]

صنایع بیسکوئیت و شیرینی و هم‌چنین صنعت شکلات‌سازی و ... باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولین محترم مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، بخش تحقیقات بیماری‌های باکتریایی دام مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال جهت فراهم آوردن امکانات پژوهشی برای انجام این تحقیق ابراز می دارند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.8.7]

منابع

1. Kurman JA ,Rašić J ,Robinson R.K. The health potential of products containing bifidobacteria. Therapeutic properties of fermented milks. Elsevier Applied Food Sciences, London, UK 1991; In Robinson RK (ed): 117-158.

2. Fook L.J ,Gibson G.R. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. FEMS Microbiol Ecol, 2002; 1;39(1):67-75.

3. Rocha-Ramírez L.M ,Pérez-Solano R.A ,Castañón-Alonso S.L ,Moreno Guerrero S.S ,Ramírez Pacheco A ,García Garibay M ,Eslava C. Probiotic Lactobacillus Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. J Immunology Res, 2017; (1):1-14.

4. Haghshenas B ,Abdullah N ,Nami Y ,Radiah D ,Rosli R ,Yari Khosroushahi A. Microencapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum*15HN using alginate-psyllium-fenugreek polymeric blends. journal of applied microbiology, 2015; 118(4): 1048-1057.

5. Nazzaro F , Fratianni F ,Nicolaus B ,Poli A ,Orlando P. The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. Elsevire, 2012; 18(3):280-285.

6. Jantzen M ,Göpel A ,Beermann C. Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. journal of applied microbiology, 2013; 115(4): 1029-1036.

7. Eratte D ,Dowling K ,Barrow C.J ,Adhikari B.P. *In-vitro* digestion of probiotic bacteria and omega-3 oil co-microencapsulated in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates. Elsevire, 2017; 227: 129-136.

8. Possemiers S ,Marzorati M ,Verstraete W ,Van de Wiele T. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. Elsevire, 2010; 141(11-2):97-103.

9. Abbasi S ,Farzanmehr H. Optimization of the formulation of prebiotic milk chocolate based on rheological properties. Food Technology and Biotechnology, 2008; 47(4): 396-403.

10. Khosravi Zanjani MA ,Ghiassi Tarzi B ,Sharifan A ,Mohammadi N. Microencapsulation of Probiotics by Calcium Alginate-gelatinized Starch with Chitosan Coating and Evaluation of Survival in Simulated Human Gastro-intestinal Condition. Iranian Journal of pharmaceuticacl research, 2013;13(3):843-852.

11. Petronijevic JL ,Popov-Raljić J ,Obradović D ,Radulović Z ,Paunović D ,Petrušić M ,Pezo L.Viability of probiotic strains Lactobacillus acidophilus NCFM® and Bifidobacterium lactis HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolates during storage for 180 days. Elsevire, 2015; 15:541-550.

12. Livney Y.D. Milk proteins as vehicles for bioactives. Elsevire, 2010; Volume 15, Issues 1–2.

13. Heidebach T, Först P ,Kulozik U. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. Elsevire,2009; Volume 23, Issue 7: Pages 1670-1677.

14. Semyonov D ,Roman O ,Kaplun Z. Microencapsulation of Lactobacillus paracasei by spray freeze drying. Food Research International, 2009; 43(1):193-202.

15. Eckert C. Serpa V.G. Santos A. Microencapsulation of Lactobacillus plantarum ATCC 8014 through spray drying and using dairy whey as wall materials. ResearchGate, 2017; Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 82(5):176-183.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.8.7]

16. Anderson J.W. Gilliland S.E. Effect of fermented milk (yogurt) containing Lactobacillus acidophilus L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. NIH, 19999; 18(1):43-50.

17. Favaro-Trindade C.S., Grosso C.R.F. (2002) Microencapsulation of L. acidophilus (La-05) and B. lactis (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. Journal of Microencapsulation, 19: 485–494 .

18. Mohammadi N, Ahari H, Fahimdanesh M, Zanjani MAK, Anvar A and Shokri E. Survival of alginateprebiotic microencapsulated Lactobacillus acidophilus in mayonnaise sauce. Iran. J. Vet. Med. (2012) 6: 259-264.

19. Hansen LT, Allan-Wojtas PM, Jin YL and Paulson AT. Survival of Ca-alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. Food Microbiol. (2002) 19: 35-45.

20. Krasaekoopt W, Bhandari B and Deeth HC. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. LWT-Food Sci. Technol. (2006) 39: 177-183.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.8.7]