

Evaluation of the Prebiotic Properties of *Ganoderma lucidum* and *Lentinula edodes* Polysaccharides in Enhancing Dairy Yeast and Bacterial Isolates

M. Larypoor¹, N. Jameyi¹, H. Dadgostar¹, J. Nowroozi¹

1- Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

(* - Corresponding Author Email: m.larypoor@iau.ir)

Received: 07.06.2025

Revised: 01.07.2025

Accepted: 19.07.2025

Available Online: 18.08.2025

How to cite this article:

Larypoor, M., Jameyi, N., Dadgostar, H., & Nowroozi, J. (2025). Evaluation of the prebiotic properties of *Ganoderma lucidum* and *Lentinula edodes* polysaccharides in enhancing dairy yeast and bacterial isolates. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 21(4), 431-450. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.93907.1443>

Introduction

Probiotics are live, beneficial microorganisms that, when administered in adequate amounts, provide significant health benefits to the host. They play a vital role in maintaining and restoring gastrointestinal microbiota balance, improving digestion, modulating the immune system, and protecting against pathogenic bacteria. Prebiotics are non-digestible food components—typically fibers or complex carbohydrates—that selectively stimulate the growth and activity of beneficial gut microorganisms. By fostering a favorable environment for probiotics, prebiotics indirectly promote host health.

Recently, the search for natural and cost-effective prebiotic sources has intensified. Medicinal mushrooms, particularly *Ganoderma lucidum* (reishi) and *Lentinula edodes* (shiitake), have emerged as promising candidates due to their abundance of bioactive polysaccharides. These polysaccharides not only exhibit prebiotic potential but also possess antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory properties.

This study aimed to investigate the prebiotic properties of polysaccharides extracted from *G. lucidum* and *L. edodes*. Specifically, we evaluated their ability to stimulate the growth and metabolic activity of probiotic yeast and bacterial isolates obtained from traditional and industrial dairy products. These natural polysaccharides may contribute to the development of novel synbiotic products with enhanced health benefits.

Materials and Methods

Twenty dairy product samples were collected and subjected to microbial isolation to obtain yeast and bacterial strains with probiotic potential. Isolates were identified using morphological, biochemical, and molecular techniques, including PCR and sequencing.

Polysaccharides were extracted from the mycelium of *G. lucidum* and *L. edodes* via lyophilization and aqueous extraction. Carbohydrate content was determined using the phenol-sulfuric acid assay, while antioxidant capacity was assessed using the DPPH free radical scavenging method. FT-IR spectroscopy was employed to characterize chemical structures.

The prebiotic effects of the mushroom polysaccharides were evaluated by supplementing sugar-free culture media with these extracts. Growth and metabolic activity of selected probiotic isolates were compared to the controls supplemented with glucose and inulin. Enzymatic and acid digestion assays were also performed to assess the stability of the polysaccharides under simulated gastrointestinal conditions.

Results and Discussion

Multiple yeast and bacterial isolates were obtained from the dairy samples. Following biochemical screening, four isolates—A3, A10, B1, and B3—were selected for detailed analysis based on their probiotic potential. Antibiofilm testing revealed varied resistance and sensitivity profiles.

Molecular identification showed that isolate A10 was closely related to *Candida tropicalis*, while A3 matched



Saccharomyces cerevisiae. Among the bacterial isolates, B1 was identified as *Lactobacillus casei* and B3 as *Lactobacillus acidophilus*.

Polysaccharides extracted from *G. lucidum* and *L. edodes* exhibited lower reducing sugar content compared to inulin, indicating a more complex carbohydrate structure and greater resistance to enzymatic breakdown. Antioxidant assay demonstrated that, while inulin had the highest free radical scavenging activity, the mushroom polysaccharides also showed significant antioxidant properties.

FT-IR spectra confirmed the presence of characteristic polysaccharide functional groups, such as hydroxyl, carboxyl, and glycosidic linkages, consistent with previous findings on medicinal mushroom polysaccharides.

When added to sugar-free media, polysaccharides from both mushrooms stimulated the growth of probiotic isolates, though to a lesser extent than glucose and inulin. This suggests that while these fungal polysaccharides act as prebiotics, their fermentability and utilization by probiotics may differ from conventional prebiotics.

Optimal growth conditions for the probiotic isolates were observed at pH 5 and 37°C. The ability of these isolates to thrive under such conditions, along with their positive response to mushroom polysaccharides, underscores the potential of these compounds as functional prebiotic ingredients.

This study highlights the promising prebiotic and antioxidant properties of polysaccharides extracted from *G. lucidum* and *L. edodes*. These natural compounds supported the growth of beneficial probiotic yeasts and bacteria isolated from dairy products, suggesting their potential as synbiotic supplements.

Conclusion

Incorporating mushroom-derived polysaccharides into functional foods and dietary supplements could enhance gastrointestinal microbiota balance and promote overall health. However, further research involving in vivo animal models and human clinical trials is necessary to fully validate the health benefits and safety of these polysaccharides. Such studies will help clarify their mechanisms of action, determine optimal dosages, and assess long-term effects, paving the way for their application in health-promoting dietary and medicinal products.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, Prebiotic, Probiotic, Polysaccharide

مقاله پژوهشی

جلد ۲۱، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۴، ص. ۴۵۰-۴۳۱

ارزیابی خواص پری بیوتیکی پلی ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم و لنتینولا ادودس در تقویت جدایه‌های مخمری و باکتریایی لبنی

محدثه لاری پور^{۱*} - ندا جامعی^۱ - حورا دادگستر^۱ - جمیله نوروزی^۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۲۸

چکیده

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های غیر بیماری‌زا و مفیدی هستند که به سلامت بدن، بالاختصاص سلامت دستگاه گوارش و بهبود عملکرد سیستم ایمنی کمک می‌کنند. پری بیوتیک‌ها فعالیت جمعیت خاصی از پروبیوتیک‌ها در روده بزرگ را تحریک می‌کنند که به تولید متابولیت‌هایی مانند اسیدهای چرب کوتاه زنجیره منجر می‌گردد. استفاده از منابع پری بیوتیکی طبیعی ارزان قیمت، از جمله قارچ‌های دارویی می‌تواند در کیفیت زندگی مؤثر باشد. در این مطالعه ۲۰ نمونه مختلف لبنیات سنتی و کارخانه‌ای تهیه و آزمایشات مورفولوژی، بیوشیمیایی، پروبیوتیکی و مولکولی بر روی آن‌ها انجام گردید. پلی ساکاریدهای لنتینولا ادودس و گانودرما لوسیدوم با لیوفیلیزاسیون میسلیم استخراج و خواص و ویژگی‌های آن‌ها با تست‌های فل-سولفوریک اسید، دی فنیل پیکریل هیدرازیل و طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ بررسی گردید. سپس پلی ساکاریدهای استخراج شده به محیط‌کشت بدون قند اضافه و اثرات آن‌ها بر جدایه‌ها بررسی گردید. براساس الگوهای فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی، ۴ جدایه باکتریایی و مخمری با توان پروبیوتیکی با درصد تشابه حدود ۹۹/۶٪، جدایه A10 به عنوان کاندید/تروپیکالیز سویه ۱۶۹۱، جدایه A3 به عنوان ساکارومایسس سرویزیه، جدایه B1 به عنوان لاکتوباسیلوس کارژی سویه ۱۱۹۷، جدایه B3 به عنوان لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس شناسایی شدند. پلی ساکاریدهای جدا شده ویژگی‌های مطلوبی مانند فعالیت آنتی اکسیدانی، تجزیه پذیری اسیدی و آنزیمی و توانایی پری بیوتیک قابل مقایسه یا حتی بهتر از اینولین را نشان دادند. بر اساس نتایج این مطالعه، پلی ساکاریدهای جدا شده به طور همزمان می‌توانند گزینه مناسبی برای بهبود عملکرد میکروبیوتای دستگاه گوارش و اثرات سلامتی بخش باشند. این امر نیاز به مطالعات بیشتر در مدل‌های حیوانی و انسانی دارد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، پری بیوتیک، پلی ساکارید، گانودرما لوسیدوم، لنتینولا ادودس

مقدمه

سرطان، سندرم روده تحریک پذیر^۴، آرتریت روماتوئید، آکنه، زخم معده، چاقی و فشار خون بالا شود (Appanna & Appanna, 2018). از این رو توسعه و تعدیل میکروبیوتای دستگاه گوارش با استفاده از عوامل مؤثری از جمله مواد غذایی تخمیری و فراسودمند و مکمل‌های پروبیوتیکی و پری بیوتیکی مورد توجه قرار گرفته است (Holscher, 2017; Umu et al., 2017). جمعیت میکروارگانیسم‌ها در حفظ تعادل

میکروبیوتای^۲ دستگاه گوارش مجموعه‌های پیچیده و پویا از میکروارگانیسم‌ها است که با ارائه عملکردهای متابولیکی، ایمنی شناسی و حفاظتی متنوع، نقش اساسی در حفظ سلامت انسان ایفا می‌کند (Holscher, 2017; Umu, Rudi, & Diep, 2017). اختلال در تعادل جمعیت میکروبی میکروبیوتا و روابط آن‌ها به عنوان دیس بیوز^۳ نامیده می‌شود، این وضعیت می‌تواند منجر به ایجاد بیماری‌هایی مانند

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
(*)- نویسنده مسئول: Email: m.larypoor@iau.ir

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.93907.1443>

2- Microbiota

3- Dysbiosis

4- Irritable bowel syndrome (IBS)

نیستند، این ترکیبات پایدار باقی‌مانده و به‌عنوان ترکیبات غیر قابل هضم و ارزان قیمت، می‌توانند کاندید مناسبی برای منابع پری‌بیوتیکی باشند (Chou, Sheih, & Fang, 2013; Synytsya et al., 2009). از جمله خواص مورد بررسی برای منابع پری‌بیوتیکی، بررسی تأثیر این منابع بر پروبیوتیک‌های کلیدی بیفیدوباکترها^۲ و لاکتوباسیلوس‌ها^۳ می‌باشد (Manzanares, Lemieux, Langlois, & Wischmeyer, 2016; Pandey, Naik, & Vakil, 2015). به محصولات تهیه شده از پروبیوتیک و پری‌بیوتیک، سین‌بیوتیک^۴ گفته می‌شود (Synytsya et al., 2009). افزودن پری‌بیوتیک به محصولات پروبیوتیکی موجب افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها شده و ماندگاری محصولات را نیز افزایش می‌دهد، در همین راستا استفاده از فرآورده‌های سین‌بیوتک مورد توجه قرار گرفته‌است (Astashkina et al., 2014). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که پلی‌ساکاریدهای قارچی مستخرج از قارچ‌هایی مانند *لنتینولا اودوس*^۵، *گانودرما لوسیدوم*^۶، *پلوروتوس*^۷، *ترملا فوسفورمیس*^۸ و *آگاریکوس بیسپوروس*^۹ می‌توانند فعالیت پری‌بیوتیکی داشته باشند (Giavasis, 2014; Synytsya et al., 2009).

لنتینولا اودوس

لنتینولا اودوس که تحت عنوان شیتاکه نیز شناخته می‌شود، اولین ماکروقارچ دارویی است که به عرصه بیوتکنولوژی نوین وارد شده‌است و دومین قارچ خوراکی محبوب با محتوای بالایی از ترکیبات زیست فعال از جمله پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها می‌باشد (Bisen, Baghel, Sanodiya, Thakur, & Prasad, 2010; Raghukumar, 2008). به همین دلیل یکی از با ارزش‌ترین قارچ‌های دارویی است. از جمله ترکیبات پلی‌ساکاریدی زیست‌فعال این قارچ می‌توان به لنتینان اشاره نمود که دارای خواص ضد توموری، ضد ویروسی و ضد میکروبی می‌باشد (Hearst et al., 2009; Lindequist, 2024). همچنین *لنتینولا اودوس* در بیماری‌های مرتبط با ضعف در سیستم ایمنی کاربرد داشته و خواص تعدیل‌کنندگی بر سیستم ایمنی دارد، از این‌رو ترکیبات مختلف این قارچ در مطالعات گسترده‌ای مورد بررسی قرار می‌گیرد (Bisen et al., 2010; Lindequist, 2024). پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از *لنتینولا اودوس* اثرات تعدیل‌کننده سیستم ایمنی و توانایی تغییر مفید ترکیب میکروبیوتای روده را نشان داده‌اند. آن‌ها با افزایش تولید سیتوکین و بازایی نسبی پروفایل‌های میکروبیوتای

میکروبیوتا نقش بسزایی دارند از این رو پروبیوتیک‌ها^۱ به‌عنوان میکروارگانیسم‌های زنده‌ای که اگر به تعداد کافی مورد استفاده قرار بگیرند، اثرات سلامت‌بخش در میزبان از خود بروز می‌دهند، نقش کلیدی در بسیاری از مطالعات دارند (Astashkina, Khudyakova, & Kolbysheva, 2014). از طرفی دیگر میکروبیوتای دستگاه گوارش همواره در حال رشد بوده و تحت تأثیر عوامل مختلف ژنتیکی، فیزیولوژیکی و محیطی قرار دارد (Holscher, 2017; Umu et al., 2017). رژیم غذایی به‌عنوان یک عامل محیطی کلیدی مؤثر بر میکروبیوتای دستگاه گوارش، شناخته می‌شود، چراکه تأمین مواد مغذی و انرژی از جمله اقدامات همزیستی بین میکروارگانیسم‌ها و میزبان می‌باشد (Holscher, 2017; Umu et al., 2017). در واقع، مصرف مواد غذایی خاص می‌تواند راهی برای تعدیل میکروبیوتا و حفظ جمعیت پروبیوتیک‌ها باشد (Holscher, 2017). پری‌بیوتیک یک ماده تخمیری انتخابی است که از طریق ایجاد تغییراتی بر میکروبیوتای دستگاه گوارش اثرات مفیدی در حفظ سلامتی میزبان از جمله تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره، کاهش کلون‌زایی پاتوژن‌ها، تحریک سیستم ایمنی، افزایش جذب مینرال‌ها، کاهش ریسک سرطان روده، عوامل مرتبط با چاقی و سندروم متابولیک و بهبود حساسیت به انسولین را دارد (Saad, Delattre, Urdaci, Schmitter, & Bressollier, 2013; Synytsya et al., 2009). انواع مختلفی از پری‌بیوتیک‌ها شناسایی شده‌اند از آن‌ها می‌توان به اینولین، صمغ‌های فیبری، رافینوز، پیرودکستین، زایلان، استاکیوز، مالتودکستین، لاکتولوز، گزیلوالیگوساکارید، لاکتوسوکروز، رافینوز، لاکتولوز و فروکتوالیگوساکارید اشاره نمود (Synytsya et al., 2009). پیشرفت‌های اخیر در این حوزه، توجه دانشمندان را به بررسی منابع جدید پری‌بیوتیکی جلب نموده‌است، قارچ‌ها از دیرباز به لحاظ خواص دارویی در کشورهای شرق آسیا مورد توجه قرار داشته‌اند. مطالعات گسترده‌ای خواص دارویی قارچ‌های ماکروسکوپی را بررسی و اثبات نموده‌اند (Gao, Zhou, Chen, Dai, & Ye, 2002; Moradali et al., 2007). قارچ‌ها به‌دلیل داشتن کربوهیدرات‌هایی نظیر کیتین، همی سلولز، ماناز، زایلان و گالاکتان بهترین کاندید به‌عنوان منبع پری بیوتیکی می‌باشند. پلی‌ساکاریدهای قارچ‌ها از ترکیبات شیمیایی متفاوتی تشکیل شده‌اند، اکثر پلی‌ساکاریدهای قارچ‌ها به‌صورت گلوکان‌های خطی و زنجیره‌دار با پیوندهای بتاگلیکوزیدی مختلفی می‌باشند. از آن جایی که آنزیم‌های گوارشی قادر به تجزیه پیوندهای بتاگلوکوزیدی

6- *Ganoderma lucidum*7- *Pleurotus*8- *Tremella fusiformis*9- *Agaricus bisporus*

1- Probiotic

2- Bifidobacteria

3- Lactobacillus

4- Synbiotic

5- *Lentinula edodes*

پگاه، پاژن و هراز) در ظروف استریل جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. سوسپانسیون اولیه بر اساس نوع فرآورده در محلول رقیق کننده (رینگر) تهیه شد. از نمونه‌ها رقت‌های سریالی تا رقت ۰/۰۰۱ تهیه شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های لینی رقیق شده با رقت ۰/۰۰۱ به منظور جداسازی مخمر بر روی محیط مخمر گلوکز کلرامفیکل آگار^۲ به صورت چمنی کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت حداقل ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. همچنین به منظور جداسازی باکتری ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های لینی رقیق شده با رقت ۰/۰۰۱ بر روی محیط کشت MRS آگار، برای رشد باکتری‌های پروبیوتیک به‌ویژه لاکتوباسیلوس‌ها، کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت در جار بی‌هوازی نگهداری شدند (Dworkin, Falkow, Rosenberg, Schleifer, & Stackebrandt, 2006).

شناسایی مورفولوژی جدایه‌ها و تهیه کشت خالص

بررسی کلنی‌ها بر اساس رنگ، اندازه و مورفولوژی انجام گردید. سپس برای تشخیص اولیه جدایه‌های مخمری از رنگ‌آمیزی با لاکتوفل کاتن بلو^۳ و برای بررسی جدایه‌های باکتریایی از رنگ‌آمیزی گرم استفاده گردید. سپس کشت خالص از جدایه‌ها تهیه و نگهداری گردید (Madigan, Bender, Buckley, Sattley, & Stahl, 2018).

تست تخمیر قند و جذب ازت جدایه‌ها

جدایه‌ها به منظور بررسی تخمیر قند و جذب ازت به ترتیب بر روی محیط حاوی قند و محیط حاوی نیترات کشت داده شدند. محیط تخمیر قند از قندهای گلوکز، ساکارز، مالتوز، مانیتول، سوربیتول و آرابینوز و معرف فنل رد با pH حدود ۷ تهیه شد. جدایه‌های باکتریایی و مخمری پس از کشت به مدت ۴۸ ساعت به ترتیب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جار بی‌هوازی و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از دوره انکوباسیون مشاهده‌ی تغییر رنگ محیط، ثبت گردید (Cappuccino & Sherman, 2013).

تست تولید آسکواسپور و اوره آز برای جدایه‌های مخمری

به منظور بررسی تولید آسکواسپور و اوره آز در جدایه‌های مخمری، به ترتیب از رنگ آمیزی با رنگ مالاشیت گرین^۴ با استفاده از حرارت و کشت در محیط اوره و انکوباسیون به مدت ۴ ساعت، استفاده گردید (Madigan et al., 2018).

جوانی، رشد میکروب‌های مفید را افزایش داده و پاسخ‌های ایمنی را، به‌ویژه در مدل‌های پیری، بهبود می‌بخشد (Xu, Yang, Ning, & Zhang, 2015; Yin et al., 2023).

گانودرما لوسیدوم

گانودرما لوسیدوم که تحت عنوان ری‌شی نیز شناخته می‌شود، به جهت دارا بودن خواص دارویی مختلف از جمله کاهش فشار و قند خون، تقویت سیستم ایمنی، خواص ضد میکروبی و ضد سرطانی از شاخص‌ترین قارچ‌های دارویی به شمار می‌آید (Chen & Zhang, 2025; Moradali et al., 2007). از مهم‌ترین مواد فعال بیولوژیک موجود در گانودرما لوسیدوم می‌توان به تری‌ترپنوئیدها، پلی‌ساکاریدها، استرول‌ها، استروئیدها و پروتئین‌ها اشاره نمود (Gao et al., 2002; Moradali et al., 2007). خواص دارویی متعددی به پلی‌ساکاریدهای مستخرج از این قارچ اتلاق می‌شود. α/β گلوکان، گلیکوپروتئین‌ها و هتروپلی‌ساکاریدها مهم‌ترین پلی‌ساکاریدهای شناسایی شده از این قارچ می‌باشند (Rousta et al., 2024; Synytsya et al., 2009). در بررسی‌های گوناگونی نشان داده شده است که این پلی‌ساکاریدها تکثیر باکتری‌های تولیدکننده اسید چرب با زنجیره کوتاه^۱ (SCFA) را افزایش می‌دهند، عملکرد سد روده را بهبود می‌بخشند و التهاب را کاهش می‌دهند و در نتیجه به بهبود سلامت متابولیک و تنظیم ایمنی کمک می‌کنند (Delzenne & Bindels, 2015; Zheng et al., 2024).

با توجه به افزایش غذاهای فراسودمند مشتق شده از قارچ‌های دارویی، زمینه تحقیقاتی مهمی در علوم مواد غذایی و داروسازی فراهم آمده است (Rousta et al., 2024; Synytsya et al., 2009). به همین منظور این مطالعه با هدف بررسی خواص پری‌بیوتیکی پلی‌ساکاریدهای قارچ‌های خوراکی-دارویی به عنوان منبعی طبیعی بر جدایه‌های بومی با خواص پروبیوتیکی و ارائه یک مکمل غذایی پری‌بیوتیکی مؤثر در بهبود عملکرد میکروبیوتا و به منظور ارتقا سلامتی انجام شده است. در این مطالعه خواص پری‌بیوتیکی پلی‌ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم و لنتینولا / دودس بر روی رشد پروبیوتیک‌های جدا شده از محصولات لینی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌ها از محصولات لینی

۲۰ نمونه از فرآورده‌های لینی سنتی (شامل ۴ نمونه شیر، ۲ نمونه دوغ و ۴ نمونه ماست از فروشگاه‌های مربوطه در شهر تهران) و کارخانه‌ای (شامل ۳ نمونه شیر، ۳ نمونه دوغ و ۴ نمونه ماست از برند

3- Lactophenol cotton blue
4- Malachite green

1- Short-chain fatty acids
2- Yeast Glucose Chloramphenicol Agar (YGC)

تست کاتالاز و اکسیداز برای جدایه‌های باکتریایی

به‌منظور تست کاتالاز از مجاورت باکتری با آب اکسیژنه ۳ درصد و به‌منظور تست اکسیداز از مجاورت باکتری با کاغذ صافی آغشته به معرف تترامیلین پارافینیلین دی آمین دی هیدروکلراید^۱ استفاده و به ترتیب تولید حباب و تغییر رنگ بررسی و ثبت گردید (Zhao et al., 2024).

تعیین خواص پروبیوتیکی جدایه‌ها

بررسی رشد در دماهای مختلف

به‌منظور بررسی مقاومت جدایه‌ها در برابر دما، کشت تازه‌ای از جدایه‌ها با کدورت معادل نیم مک فارلند تهیه و در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۲ سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. سپس در فواصل زمانی ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان جذب در طول موج ۶۲۵ nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانش گردید (Fontana, Bermudez-Brito, Plaza-Diaz, Munoz-Quezada, & Gil, 2013; Gomes & Malcata, 1999).

بررسی مقاومت به شرایط اسیدی و قلیایی

به‌منظور بررسی مقاومت جدایه‌ها در برابر شرایط اسیدی و قلیایی، به‌ترتیب pH محیط کشت با استفاده از هیدروکلریک اسید ۱ نرمال و سدیم هیدروکسید، در pH های ۱/۵، ۲، ۳ و ۵ تنظیم گردید. کشت تازه‌ای از جدایه‌ها در محیط کشت‌ها تهیه و گرماگذاری گردید. سپس در فواصل زمانی ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان جذب در طول موج ۶۲۵ nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانش گردید (Cook & Gilbert, 1969; Zhao et al., 2024).

بررسی مقاومت به نمک‌های صفراوی

به‌منظور بررسی مقاومت جدایه‌ها به نمک‌های صفراوی، محیط کشت‌های پایه مورد استفاده حاوی ۰/۳ درصد نمک‌های صفراوی (سدیم کولات و سدیم دزوکسیکولات) تهیه گردید (Gao et al., 2002). کشت تازه‌ای از جدایه‌ها در محیط کشت‌ها تهیه و گرماگذاری گردید. سپس در فواصل زمانی ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان جذب در طول موج ۶۲۵ nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانش گردید (Cook & Gilbert, 1969).

تست آنتی‌بیوگرام

به‌منظور انجام این تست ابتدا، سوسپانسیون استاندارد با کدورت معادل نیم مک فارلند از کشت تازه جدایه‌ها در آب مقطر استریل تهیه و میزان جذب در طول موج ۶۲۵ nm خوانش گردید. کشت چمنی از سوسپانسیون جدایه‌های مخمری بر روی محیط YGC تهیه و دیسک گذاری سه دیسک ضد قارچ فلوکونازول^۲، کتوکونازول^۳ و آموتریپسین^۴ انجام گردید. همچنین کشت چمنی از سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی بر روی محیط MRS آگار تهیه و دیسک‌گذاری با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین^۵، کلیندامایسین^۶، جنتامایسین^۷، سفتازیدیم^۸، کلرامفنیکل^۹، استرپتومایسین^{۱۰}، ونکومایسین^{۱۱} و لووفلوکساسین^{۱۲} انجام گردید. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری، قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و ثبت گردید (Mohanty & Ray, 2016; Wayne, 2010).

شناسایی مولکولی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای

پلیمرز (PCR)^{۱۳}

به‌منظور شناسایی مولکولی جدایه‌های دارای توان پروبیوتیکی، DNA جدایه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت زیست فناوری پیشگام، ایران) استخراج گردید، سپس واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی برای توالی 16S rRNA برای جدایه‌های باکتریایی به‌صورت ۳۵ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. همچنین واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 برای توالی ITS برای جدایه‌های مخمری، به‌صورت ۳۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۷ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. سپس توالی‌یابی نمونه‌ها به روش سنگر توسط شرکت Bioneer، کره انجام گردید. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آمده‌است. (Diosma, Romanin, Rey-Burusco, Londero, & Garrote, 2014; Zhao et al., 2024).

- 7- Gentamicin
- 8- Ceftazidime
- 9- Chloramphenicol
- 10- Streptomycin
- 11- Vancomycin
- 12- Levofloxacin
- 13- Polymerase Chain Reaction (PCR)

- 1- N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)
- 2- Fluconazole
- 3- Ketoconazole
- 4- Amphotrypsin B
- 5- Tetracycline
- 6- Clindamycin

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استفاده از PCR
Table 1- Sequences of primers used in molecular identification of isolates using PCR

توالی Sequence	نام / نوع پرایمر Primer name/type	توالی پرایمر Primer sequence
ITS	ITS1 پیشرو Forward	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
	ITS4 پیشرو Reverse	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
	16 S rRNA پیشرو Forward	5'-AGAGTTTGATCCATGGCTCAG-3'
	پیشرو Reverse	5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

مربع تقسیم و خشک گردید. در نهایت اختلاف وزن خیس و خشک و میزان بازده حاصل شد (Zhao, Dong, Chen, & Hu, 2010).

استخراج و خالص سازی پلی ساکارید از لنتینولا اودوس و گانودرما لوسیدوم

به منظور استخراج پلی ساکارید، مقدار ۱۰ گرم از هر یک از نمونه‌ها به صورت مجزا توسط ۱ لیتر آب مقطر دیونیزه به مدت ۱۷۰ دقیقه با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد با استفاده از بن ماری تیمار گردید، در ادامه نیز به وسیله سانتریفیوژ (۲۵۰۰ دور در ۱۰ دقیقه) سوپرناتانت جداسازی شده و به وسیله دستگاه تبخیر کننده دوار به ۳۰ درصد حجم اولیه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد تغلیظ یافت و مایع تغلیظ شده با یک حجم از معرف Sevag (کلروفرم: ۱ - بوتانول با نسبت، ۵ به ۱) به منظور حذف پروتئین‌ها تیمار گردید و بعد از همزدن به وسیله سانتریفیوژ ۲۵۰۰ دور در ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. لایه پایینی حاوی پلی ساکارید استخراج شده پروتئین زدایی شده با سه حجم از اتانول خالص دیالیز و به شدت همزده و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد و پلی ساکارید خام به وسیله سانتریفیوژ با تعداد دور ۲۵۰۰ دور در ۱۵ دقیقه به دست آمد و به منظور خالص شدن بیشتر لیوفیلیزه گردید (Ren, Xu, Lu, & Yin, 2018). جهت خالص سازی بیشتر پلی ساکارید استخراج شده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی دی اتیل آمینواتیل سفادکس A-25 استفاده گردید. جهت پاک نمودن این ستون، ابتدا مقدار ۵ گرم از پودر خشک وزن شده و داخل بافر اتصال دهنده به منظور افزایش حجم مدت یک شبانه روز قرار داده شد با سپری شدن این مدت به آرامی به نحوی که در ستون حباب هوا ایجاد نشود به داخل ستون متصل شده به گیره نگهدارنده، هدایت گردید و بعد از قرارگیری درست، شستشو نمونه با حدود ۳ الی ۴ برابر حجم ستون با

تهیه و کشت قارچ

قارچ‌های لنتینولا اودوس و گانودرما لوسیدوم به شرکت قارچ ایران زمین تهیه شد. سپس میسلیوم هر دو قارچ در محیط جامد، PDA کشت داده شد تا کشت انبوهی از هر دو قارچ در اختیار باشد. سپس میسلیوم قارچ لنتینولا اودوس و گانودرما لوسیدوم در دو محیط کشت مایع، PDB و محیط ترکیبی تلقیح شده و به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه انکوبه گردید (محیط ترکیبی شامل ۳۰ گرم در لیتر گلوکز، ۲ گرم در لیتر پپتون، ۳ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۰/۵ گرم در لیتر $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱/۵ گرم در لیتر KH_2PO_4 ، ۱ گرم در لیتر MgSO_4 و به مقدار ۰/۰۲ گرم در لیتر ویتامین B1). سپس بیومس و تراکم میسلیوم قارچ مورد بررسی قرار گرفت (Stamets, 2011; Zarmi et al., 2022).

لیوفیلزاسیون میسلیوم و جسم بارده^۱ قارچ

به منظور خشک نمودن میسلیوم و جسم بارده قارچ از تکنیک لیوفیلزاسیون و با استفاده از دستگاه فریزدرایر^۲ آزمایشگاهی (Telstar Lyo Quest، اسپانیا) استفاده گردید. بدین منظور ابتدا میسلیوم کشت داده شده سه مرتبه با آب مقطر با هدف خارج شدن محیط کشت شستشو شده و قبل از خشک شدن توزین و وزن آن ثبت گردید، سپس میسلیوم بعد از فریز کردن در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، آماده انجام فرایند می گردد. فرایند لیوفیلزاسیون به مدت ۲۴ ساعت در فشار ۶۵ بار در دمای ۶۰- درجه سانتی گراد و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انجام گرفت. سپس به منظور حذف ضایعات شستشو، به وسیله مقداری اتانول ۷۰ درصد در سطح استریل و به ابعاد ۱×۱ سانتی متر

دی‌هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)، سود (NaOH) و آنزیم پانکراتین (Pancreatin, Sigma-Aldrich, P1750) با pH برابر ۷/۴ تهیه شد. همچنین برای شبیه‌سازی ترکیبی شیر معده و روده، دو محلول فوق به نسبت ۳۹:۶۱ با pH برابر ۴/۵ ترکیب شدند. پلی‌ساکارید استخراج شده و اینولین به ترکیبات فوق اضافه شده و در انکوباتور شیکردار با دور ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت گرماگذاری گردید، سپس سانتریفوژ شده و از بافر رویی برای اندازه‌گیری قند آزاد نمونه‌برداری شد. از روش دی‌نیترو سالیسیلیک اسید (DNS)^۲ برای اندازه‌گیری قند آزاد استفاده شد. درصد هیدرولیز بر اساس میزان قند آزاد شده نسبت به قند کل گزارش شد (Fan, Mazza, & Liao, 2010; Jain, Jain, Gupta, & Ahirwar, 2007).

بررسی خصوصیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراج شده

به این منظور، ۰/۲ گرم از پلی‌ساکارید با ۵ میلی‌لیتر متانول مخلوط و توسط انکوباتور شیکردار به مدت ۳ ساعت مخلوط گردید. سپس در ۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی مورد استفاده قرار گرفت. از محلول ۱۰۰۰ میکرومولار اسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای بررسی اثر غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراج شده محدوده غلظتی ۰/۴-۰/۰۵ g/mL نمونه تهیه گردید و سپس عملیات هم‌زدن و سانتریفوژ کردن انجام گردید. برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)^۳ استفاده شد، سپس جذب در ۵۱۷ nm خوانش و با استفاده از فرمول زیر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی محاسبه گردید (Fan et al., 2010).

$$\text{Scavenging activity\%} = \frac{(\text{Abs} [\text{blank}] - \text{Abs} [\text{sample}])}{\text{Abs} [\text{blank}]} \times 100$$

Absblank: جذب محلول متانولی DPPH بدون نمونه پلی‌ساکاریدی

Abssample: جذب محلول متانولی DPPH با نمونه پلی‌ساکاریدی

بررسی تأثیر پلی‌ساکارید استخراج شده بر رشد باکتری پروبیوتیک

باکتری لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس به عنوان باکتری شاخص انتخاب شد. از محیط MRS بدون قند حاوی ۲ درصد (w/v) پلی‌ساکارید استخراج شده، محیط حاوی ۲ درصد گلوکز و محیط حاوی ۲

لودینگ بافر فسفات سالین با pH حدود ۴/۵، انجام گرفت. سپس نمونه استخراج شده به منظور خالص‌سازی در داخل این ستون با ابعاد ۵/۱×۱۰ سانتی متر اعمال شد. به این صورت که ستون با یک شیب خطی از محلول ۱۰×۰/۲ مولار NaCl با جریانی با سرعت ۰/۴۴ میلی‌لیتر در دقیقه شسته و فراکشن‌های خروجی با میکروتیوپ به مقدار ۲ میلی‌لیتر در هر یک جمع‌آوری و به منظور تعیین غلظت مورد بررسی واقع گردید. سپس میزان بازبایی پلی‌ساکاریدها با وزن نمودن محصول نهایی و مقایسه با وزن اولیه محاسبه گردید (Nielsen, 2009).

اندازه‌گیری غلظت کلی پلی‌ساکارید استخراج شده

به منظور تعیین غلظت کلی ساکارید استخراجی از روش فنول - سولفوریک اسید استفاده گردید. ۵۰ میکرولیتر از نمونه به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ چاهکی منتقل شده و به سرعت مقدار ۱۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک غلیظ به هر یک از چاهک‌ها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه توسط شیکر، مخلوط گردید. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از فنول ۵ درصد در آب اضافه و ۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و بعد از کمی خنک شدن مجدداً در یک حمام آب دیگر معادل با دمای محیط ۵ دقیقه قرار گرفت و میزان جذب ماورابنفش نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ nm توسط دستگاه الیزاریدر خوانش گردید (Masuko et al., 2005).

شناسایی خصوصیات ساختاری پلی‌ساکارید استخراج شده با روش تبدیل فوریه مادون قرمز^۱

شناسایی ساختار پلی‌ساکارید استخراج شده با استفاده از طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) با استفاده از دستگاه اسپکترومتر مجهز به سیستم ATR انجام گردید (Norajit, Kim, & Ryu, 2010).

بررسی پلی‌ساکارید استخراج شده از نظر هضم اسیدی و آنزیمی

برای بررسی مقاومت به هضم اسیدی و آنزیمی پلی‌ساکارید استخراج شده، از شبیه‌سازی شیرهای گوارشی استفاده گردید. از ترکیب اینولین تجاری به عنوان پری‌بیوتیک شاخص برای مقایسه استفاده گردید. جهت شبیه‌سازی شرایط معده، محلول شیر معده شامل کلرید سدیم (NaCl)، اسید کلریدریک (HCl) و آنزیم پیپسین (Pepsin, Sigma-Aldrich, P6887) با pH برابر ۰/۲ ± ۰/۵ تهیه گردید. برای شبیه‌سازی شرایط روده، محلول شیر روده شامل پتاسیم

3- 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

1- Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)
2- 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

نمونه استاندارد مخمر، جدایه A10 و جدایه A3 در pH~5، دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد رشد و سازگاری بهتری داشتند. همچنین توانایی رشد در حضور نمک‌های صفاوی را دارند، اما رشد آن‌ها کاهش یافت. همچنین در pH حدود ۳ ابتدا رشد خوبی داشته اما بعد از گذشت حدود ۶ ساعت رشد کاهش یافت. جدایه A3 در pH حدود ۲ نسبت به سویه استاندارد نسبتاً رشد بهتری داشت. نتایج بررسی مقاومت نمونه‌های مخمری به حرارت، pH اسیدی و نمک صفاوی در شکل ۱ نشان داده شده است. نمونه استاندارد باکتریایی، جدایه B1 و جدایه B3 در pH حدود ۵، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بهترین سازگاری را داشتند. همچنین توانایی رشد در حضور نمک‌های صفاوی را دارند، اما رشد آن‌ها کاهش یافت. در مجموع جدایه‌های مخمری و باکتریایی در همه pH های مورد بررسی رشد داشتند. اکثر جدایه‌ها بهترین رشد را در pH حدود ۵ داشتند. جدایه‌های مخمری در pH حدود ۳ نسبت به جدایه‌های باکتریایی رشد بهتری داشتند. جدایه‌های مخمری در دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد رشد و سازگاری بهتری نسبت به دمای ۴۲ و ۳۷ درجه سانتی گراد داشتند. جدایه‌های باکتریایی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بهترین سازگاری را داشتند. نتایج مربوط به رشد در حضور نمک صفاوی نشان داد که تمامی جدایه‌های مورد نظر توانایی رشد داشته، اما رشد آن‌ها نسبت به کنترل کاهش داشته است. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل (n=3) انجام شده و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار در شکل ۲ نشان داده شده است.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استفاده از PCR انجام گردید. تصاویر ژل داک حاصل از PCR جدایه‌های مخمری و باکتریایی به ترتیب در شکل a۳ و b۳ آورده شده است. نتایج بلاست توالی در پایگاه داده NCBI نشان داد که با درصد تشابه حدود ۹۹/۶ درصد، جدایه A10 به عنوان *Candida tropicalis* سویه ۱۶۹۱، جدایه A3 به عنوان *Saccharomyces cerevisiae* سروریز ۴، نمونه استاندارد مخمر به عنوان *Saccharomyces cerevisiae* سروریز، جدایه B1 به عنوان *Lactobacillus casei* کازئی سویه ۱۱۹۷، جدایه B3 به عنوان *Lactobacillus casei* / *Sidophilus* ۴ و نمونه استاندارد باکتری به عنوان *Lactobacillus casei* / *Sidophilus* سویه JCM 1132^۵ شناسایی شدند. نتایج توالی یابی در جدول ۴ بیان شده است. همچنین درخت فیلوژنی با استفاده از روش Maximum Likelihood با نرم افزار مگا ۷ رسم گردید که در شکل c۳ و d۳ نشان داده شده است.

درصد اینولین استفاده گردید. سوسپانسیون باکتری *Lactobacillus*، جدایه‌های باکتریایی و جدایه‌های مخمری با غلظت معادل نیم مک فارلند به نسبت ۲ درصد (v/v) به محیط‌های مذکور اضافه گردید. از نمونه‌های کشت داده شده در فواصل زمانی ۲، ۴، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نمونه برداری شده و میزان جذب در طول موج ۶۲۰ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانش گردید (Gomes & Malcata, 1999).

آنالیز آماری

دسته بندی نتایج و رسم نمودارها با استفاده از برنامه اکسل ۲۰۱۶ و آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۵ انجام گردید.

نتایج و بحث

جدا سازی جدایه‌ها و بررسی خصوصیات مورفولوژی

از ۲۰ نمونه لبنی اولیه، پس از شناسایی اولیه مورفولوژی، ۱۰ جدایه مخمری (A1-A10) و ۴ جدایه باکتریایی (B1-B4) بدست آمد و از آن‌ها کشت خالص تهیه گردید. نمونه‌ها شامل ۶ جدایه مخمری از شیر، ۴ جدایه مخمری از ماست، ۱ جدایه باکتریایی از دوغ، ۲ جدایه باکتری از شیر و ۱ جدایه باکتریایی از ماست می‌باشند.

تست‌های بیوشیمیایی (جذب و تخمیر قند، جذب ازت،

اوره آن، کاتالاز و اکسیداز)

نتایج تست‌های بیوشیمیایی جدایه‌ها در جدول ۲ بیان شده است. بر اساس نتایج به دست آمده ۴ جدایه A3، A10، B1 و B3 به منظور انجام تست‌های آتی انتخاب گردیدند.

تست آنتی بیوگرام

قطر هاله عدم رشد در ۴ جدایه منتخب A3، A10، B1 و B3 اندازه گیری شده، با نقاط برش (Breakpoints) مشخص شده در جداول CLSI 2023 مقایسه و طبقه بندی S، I، R انجام گردیده و در جدول ۳ گزارش گردید.

تعیین خواص پروبیوتیکی جدایه‌ها (مقاومت جدایه‌ها به

حرارت، pH اسیدی و نمک صفاوی)

4- *Lactobacillus acidophilus*

5- *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132

1- *Candida tropicalis* 1691

2- *Saccharomyces cerevisiae*

3- *Lactobacillus casei* 1197

جدول ۲- نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی جدایه‌ها
Table 2- Results of biochemical tests of isolates

نتایج تخمیر کربوهیدرات جدایه‌ها Results of carbohydrate fermentation of isolates							
کربوهیدرات Carbohydrate	سوربیتول Sorbitol	مانیتول Mannitol	مالتوز Maltose	آرابینوز Arabinose	ساکارز Sucrose	گلوکز Glucose	دکستترین Dextrin
جدایه‌ها Isolates							
A1	+	-	-	-	+	+	-
A2	-	+	-	-	+	+	+
A3	-	-	+	-	+	+	+
A4	-	-	+	-	-	+	-
A5	-	+	+	-	+	+	-
A6	-	+	+	-	+	+	+
A7	-	-	+	+	+	+	-
A8	-	-	+	-	+	+	-
A9	+	-	+	+	+	+	-
A10	-	-	+	-	+	+	-
B1	-	+	-	-	+	+	+
B2	-	+	-	+	-	+	+
B3	-	-	+	-	+	+	-
B4	-	-	+	-	+	+	+

نتایج آزمایش کاهش نیتрат و آزمایش اوره‌آز جدایه‌های مخمر Results of the nitrate reduction test and the urease test of yeast isolates		
جدایه‌ها Isolates	آزمایش کاهش نیترات Nitrate Reduction Test	آزمایش اوره‌آز Urease Test
A1	+	+
A2	+	+
A3	+	-
A4	-	-
A5	-	+
A6	+	+
A7	-	+
A8	-	+
A9	+	-
A10	+	-

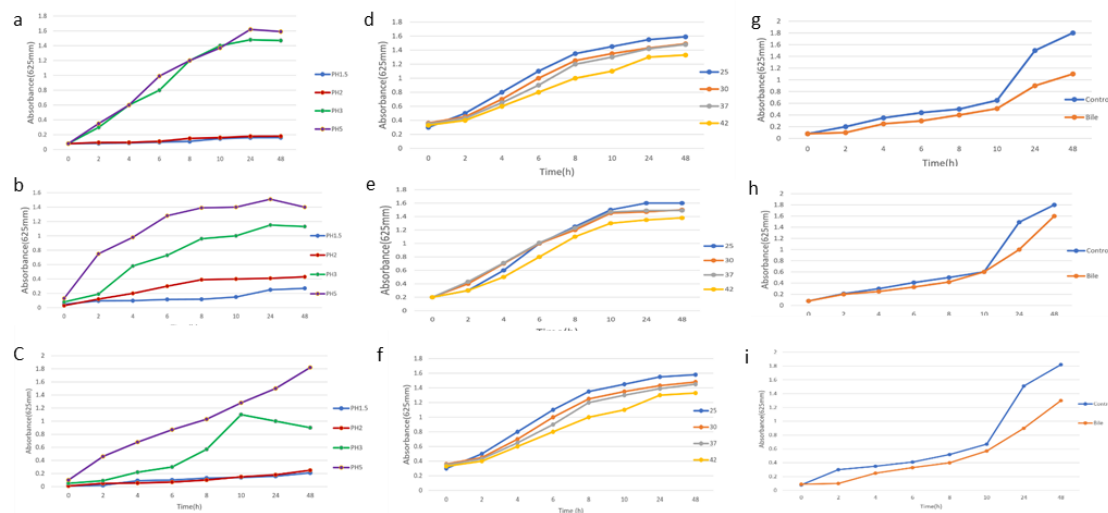
نتایج آزمایش کاتالاز و اکسیداز جدایه‌های باکتریایی Catalase and oxidase test results of bacterial isolates		
جدایه‌ها Isolates	آزمایش کاتالاز Catalase Test	آزمایش اکسیداز Oxidase Test
B1	-	-
B2	+	-
B3	-	-
B4	+	+

جدول ۳- نتایج آنتی بیوگرام جدایه‌ها
Table 3- Antibigram results of isolates

جدایه‌ها Isolates	A3	A10	B1	B3
آنتی بیوتیک Antibiotics				
کتوکنازول Ketoconazole	S	S	-	-
فلوکنازول Fluconazole	R	R	-	-
آمفوتریپسین B Amphotrypsin B	I	I	-	-
تتراسایکلین Tetracycline	-	-	S	S
جنتامایسین Gentamicin	-	-	S	I
استرپتومایسین Streptomycin	-	-	R	R
ونکومایسین Vancomycin	-	-	R	R
کلیندامایسین Clindamycin	-	-	I	S
سفازیدیم Cefazidime	-	-	R	R
لووفلوکساسین Levofloxacin	-	-	R	I
کلرامفنیکل Chloramphenicol	-	-	S	S

*S: حساس، R: مقاوم، I: نسبتاً حساس

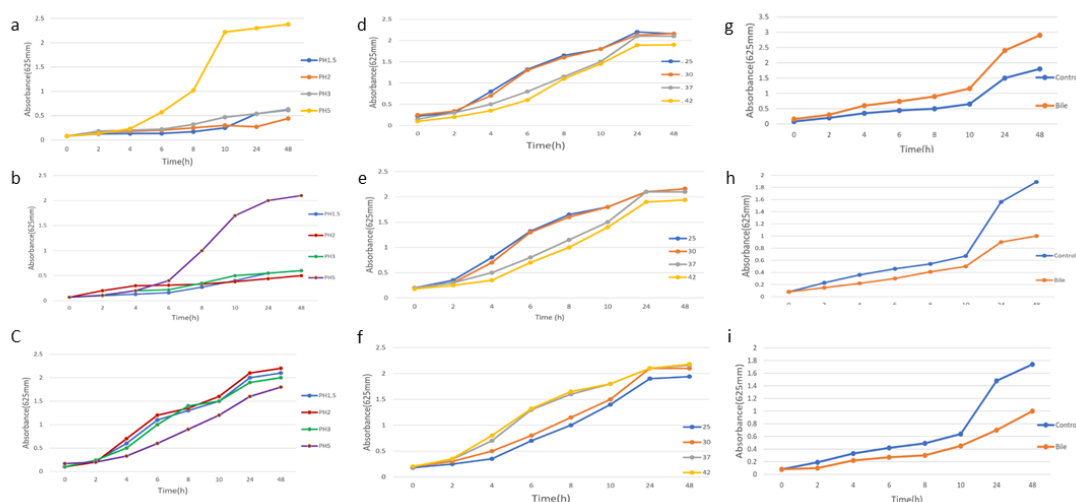
*S: Susceptible, R: Resistant, I: Intermediately Susceptible



شکل ۱- a. بررسی مقاومت در برابر pH های مختلف در نمونه مخمر استاندارد، b. در جدایه A3، c. در جدایه A10، d. مقاومت در برابر دماهای مختلف در نمونه مخمر استاندارد، e. در جدایه A3، f. در جدایه A10، g. مقاومت در برابر نمک‌های صفراوی در نمونه مخمر استاندارد، h. در جدایه A3، i. در جدایه A10

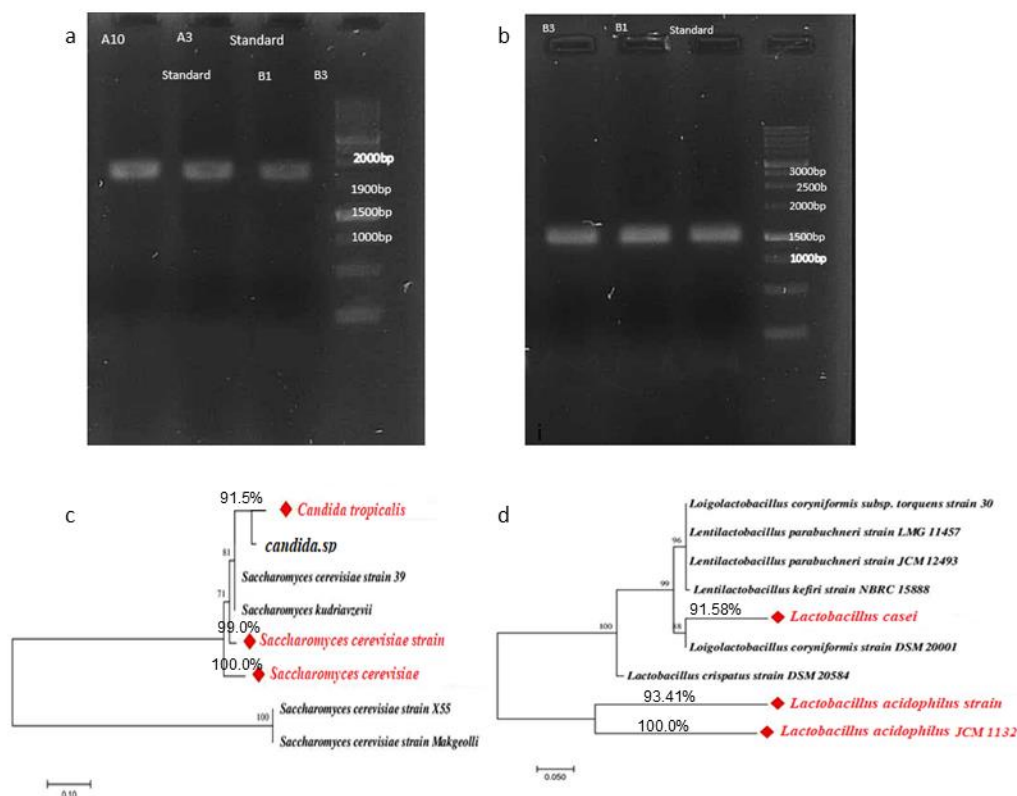
(داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (n=3) نمایش داده شده‌اند).

Fig. 1. a. Study of resistance to different pH in the standard yeast sample, b. In isolate A3, c. In isolate A10, d. Resistance to different temperatures in the standard yeast sample, e. In isolate A3, f. In isolate A10, g. Resistance to bile salts in the standard yeast sample, h. In isolate A3, i. In isolate A10 (The data are presented as mean $\pm$ standard deviation (n=3)).



شکل ۲- a. بررسی مقاومت در برابر pH های مختلف در نمونه باکتری استاندارد، b. در جدایه B1، c. در جدایه B3، d. مقاومت در برابر دماهای مختلف در نمونه باکتری استاندارد، e. در جدایه B1، f. در جدایه B3، g. مقاومت در برابر نمک های صفراوی در نمونه باکتری استاندارد، h. در جدایه B1، i. در جدایه B3

Fig. 2. a. Study of resistance to different pH in the standard bacteria sample, b. In isolate B1, c. In isolate B3, d. Resistance to different temperatures in the standard bacteria sample, e. In isolate B1, f. In isolate B3, g. Resistance to bile salts in the standard bacteria sample, h. In isolate B1, i. In isolate B3



شکل ۳- شناسایی مولکولی جدایه ها. a. تصاویر ژل داک حاصل از PCR از مخمر و b. جدایه های باکتریایی. c. درخت فیلوژنتیک جدایه های مخمر، d. درخت فیلوژنتیک جدایه های باکتریایی

Fig. 3. Molecular identification of isolates. a. Images of PCR-derived gel doc of yeast and b. bacterial isolates. c. Phylogenetic tree of yeast isolates, d. Phylogenetic tree of bacterial isolates

جدول ۴- نتایج تعیین توالی جدایه ها و نمونه استاندارد

Table 4- Sequencing results of isolates and the standard sample

نمونه Sample	شناسایی شده Identified	شباهت Similarity	طول توالی Sequence length	شماره دسترسی Accession number	شناسه شناسایی RID
B1	<i>Lactobacillus casei</i>	91.58%	1486	MW-073405.1	KUGW7ABS016
B3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> strain	93.41%	1104	CP-025428.1	KUDZCWFJ013
سویه باکتری استاندارد Standard bacterial strain	<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM 1132	100.00%	1176	CP025428	KU794UGF016
A3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain	99.0%	781	MT136553.1	KV0CA4FB01R
A10	<i>Candida tropicalis</i>	91.50%	1295	KT-807957.1	KV0GZAJA016
سویه مخمر استاندارد Standard yeast strain	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100.0%	2158	MH047190.1	KV2HHGVR013

*جزئیات تعیین توالی: تعیین توالی با دستگاه های Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzer، شرکت Bioneer، کره، به روش سنگر

*Sequencing details: Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzers Sequencing Bioneer, Korea, Sanger method

میزان بازیابی پلی ساکاریدها

میزان بازیابی پلی ساکاریدهای خالص نهایی حدود ۷٪ (w/w) نسبت به وزن خشک نمونه اولیه محاسبه گردید.

میزان غلظت پلی ساکاریدهای استخراج شده

میزان غلظت پلی ساکاریدهای استخراج شده با استفاده از روش فنول - سولفوریک اسید بررسی و جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانش گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، جذب پلی ساکارید استخراج شده از گانودرما لوسیدوم معادل ۰/۲۸ و غلظت آن معادل ۹۳/۳ µg/mL و جذب پلی ساکارید استخراج شده از لنتینولا ادودس معادل ۰/۴۵ و غلظت آن معادل ۱۴۴ µg/mL بدست آمد.

بررسی پلی ساکاریدهای استخراج شده از نظر هضم

اسیدی و آنزیمی

جدول ۵- نتایج اندازه گیری با استفاده از روش DNS

Table 5- Measurement results using the DNS method

نمونه Sample	جذب نوری OD	جذب در طول موج ۵۴۳ نانومتر در بافر ۱ Absorbance at 543 nm in buffer 1	جذب در طول موج ۵۴۳ نانومتر در بافر ۲ Absorbance at 543 nm in buffer 2
اینولین Inulin		0.22	0.40
پلی ساکارید گانودرما لوسیدوم Ganoderma lucidum polysaccharides		0.17	0.35
پلی ساکارید لنتینولا ادودس Lentinula edodes polysaccharides		0.15	0.21

بررسی خصوصی آنتی اکسیدانی پلی ساکارید استخراج

شده

خصوصیت آنتی اکسیدانی پلی ساکارید با استفاده از DPPH بررسی گردید. در بین ۲ نوع پلی ساکارید آزمایش شده و اینولین، بیشترین فعالیت پاکسازی رادیکال های آزاد DPPH به ترتیب مربوط به اینولین، پلی ساکارید/لنتینولا/دودس و گانودرما لوسیدوم می باشد. نتایج تحلیل آماری بر اساس آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با سطح معنی

داری ($p < 0.05$) نشان داد که تفاوت مشاهده شده در درصد فعالیت های بین اینولین (۵۸٪)، پلی ساکارید/لنتینولا/دودس (۴۱٪) و گانودرما لوسیدوم (۴۰٪) از نظر آماری معنی دار است ($p < 0.05$). این یافته حاکی از آن است که اینولین به طور معنی داری فعالیت های ضد اکسیدانی نسبت به دو پلی ساکارید قارچی دارد، اما تفاوت میان دو پلی ساکارید قارچی از نظر آماری معنی دار نبود ($p > 0.05$). نتایج تست DPPH در جدول ۶ آورده شده است.

جدول ۶- نتایج جذب محلول DPPH متانولی با نمونه پلی ساکارید

Table 6- Results of the adsorption of methanolic DPPH solution with the polysaccharide sample

نمونه Sample	جذب محلول متانول DPPH Absorbance of DPPH methanol solution	درصد فعالیت آنتی اکسیدانی Percentage of antioxidant activity	جذب نوری OD
اینولین Inulin	0.073	58	
پلی ساکارید گانودرما لوسیدوم Ganoderma lucidum polysaccharides	0.10	40	
پلی ساکارید/لنتینولا/دودس Lentinula edodes polysaccharides	0.11	41	

نشان دهنده ی گروه های C-H کششی آلکان ها، پیک در ناحیه cm^{-1} ۱۶۴۳ نشان دهنده ی گروه های C=C کششی آلکن ها، پیک در نواحی cm^{-1} ۱۵۰۰-۱۰۰۰ نشان دهنده ی گروه های C-H و N-H آلکان ها و آمین های نوع اول و پیک در نواحی cm^{-1} ۱۰۰۰-۵۰۰ نشان دهنده ی گروه های C-H آلکن ها می باشد. نتایج به دست آمده، نشان داد نمونه های تولید شده مطابقت فراوانی با نمونه های به دست آمده از سایر تحقیقات مربوط به آزمون FT-IR داشتند.

بررسی تأثیر پلی ساکارید استخراج شده بر رشد

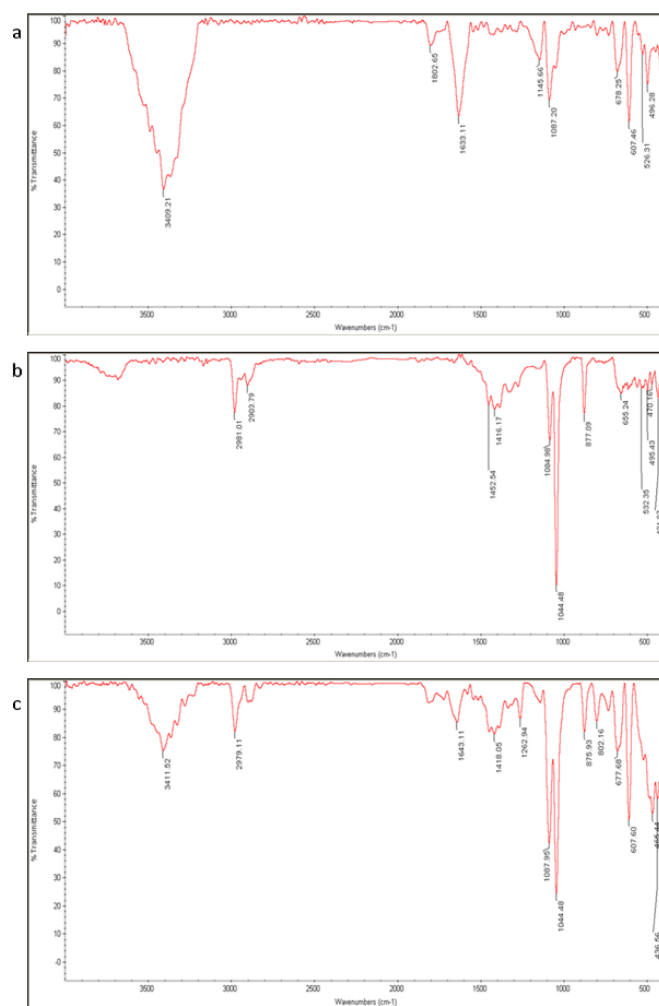
جدایه های مخمری و سویه های استاندارد

جهت انجام آزمایش از روش فاکتوریل استفاده شد، به گونه ای که اثر هم افزایی هر کدام از مؤلفه های موجود در آزمایش به صورت تکی، دوتایی و سه تایی مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل وجود دو متغیر حالت های مختلفی برای ترکیب آنها وجود داشت که تمامی حالت ها بررسی شده است. تأثیر پلی ساکاریدها بر روی یک باکتری پروبیوتیک استاندارد (لاکتوباسیلوس/اسیدفیلوس) مورد بررسی قرار گرفت که نتایج در شکل ۵a نشان داده شده است. همچنین تأثیر پلی ساکاریدها بر روی مخمر استاندارد و دو جدایه A3 و A10 به ترتیب در شکل های ۵b، ۵c و ۵d نشان داده شده است.

شناسایی خصوصیات ساختاری پلی ساکارید استخراج

شده با روش FT-IR

طیف FT-IR به دست آمده از پلی ساکارید استخراج شده از/لنتینولا/دودس در شکل ۴a نشان داده شده است. پیک در ناحیه cm^{-1} ۳۴۰۹ نشان دهنده ی گروه های N-H کششی آمین های نوع اول، در نواحی cm^{-1} ۱۸۰۲ نشان دهنده ی C=O کششی اسید هالید، در ناحیه cm^{-1} ۱۶۳۳ نشان دهنده ی گروه های C=C کششی آلکن ها و در نواحی cm^{-1} ۶۰۰-۵۰۰ نشان دهنده ی گروه های C-H خمشی آلکن ها می باشد. طیف FT-IR به دست آمده از پلی ساکارید استخراج شده از گانودرما لوسیدوم در شکل ۴b نشان داده شده است. در این نمونه، پیک در نواحی cm^{-1} ۳۰۰۰-۲۸۴۰ نشان دهنده ی گروه های C-H کششی آلکان ها، پیک در ناحیه cm^{-1} ۱۴۵۲ نشان دهنده ی گروه های C-H خمشی آلکان ها، پیک در نواحی cm^{-1} ۱۴۰۰-۱۰۰۰ نشان دهنده ی گروه های C-F کششی ترکیب فلوره، پیک در ناحیه cm^{-1} ۸۷۷ نشان دهنده ی گروه های C=C خمشی آلکن ها و پیک در نواحی cm^{-1} ۶۰۰-۵۰۰ نشان دهنده ی گروه های C-I کششی ترکیبات هالیدی می باشد. طیف FT-IR به دست آمده از ترکیب پلی ساکاریدهای استخراج شده از گانودرما لوسیدوم و/لنتینولا/دودس در شکل ۴c نشان داده شده است. در این نمونه، پیک در ناحیه cm^{-1} ۳۴۱۱ نشان دهنده ی گروه های N-H کششی آمین های نوع اول، پیک در ناحیه cm^{-1} ۲۹۷۹



شکل ۴- طیف FT-IR پلی ساکارید استخراج شده از ا. لنتینولا ادودس، ب. گانودرما لوسیدوم و ج. ترکیبی از پلی ساکارید استخراج شده از لنتینولا ادودس و گانودرما لوسیدوم

Fig. 4. FT-IR spectrum of polysaccharide extracted from a. *Lentinula edodes*, b. *Ganoderma lucidum*, c. Combination of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* and *Lentinula edodes*

ساکاریدهای قارچی ($p < 0.05$) وجود داشته است. پلی ساکارید گانودرما لوسیدوم در تمام موارد عملکرد بهتری نسب به پلی ساکارید لنتینولا ادودس داشت (مثلاً $\text{Max OD} = 0.65$ در باکتری). اختلاف بین دو پلی ساکارید در جدایه A10 معنی دار ($p < 0.05$) بود. از طرفی دیگر، جدایه A3 بالاترین پاسخ را به اینولین نشان داد ($\text{Max OD} = 0.72$) درحالی که جدایه A10 کمترین حساسیت به پلی ساکاریدها را داشت ($\text{Max OD} = 0.59$ برای پلی ساکارید لنتینولا ادودس).

با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که وجود پلی ساکارید بر روی رشد نمونه‌ها تأثیر مثبت داشته و همچنین همان‌طور که مشاهده می‌شود اینولین و گلوکز در مقایسه با پلی ساکاریدها بیشترین تأثیر را بر رشد نمونه‌ها داشته‌اند. نرخ رشد (Slope) و حداکثر جذب نوری (Max OD) برای هر یک از تیمارها در جدول ۷ به صورت کمی ارائه شده است. بالاترین مقادیر Slope و Max OD در تمامی نمونه‌ها متعلق به تیمارهای گلوکز و اینولین است (مثلاً $\text{Slope} = 0.024$ برای مخمر استاندارد تحت گلوکز) و اختلاف معنی دار بین گلوکز/اینولین با پلی

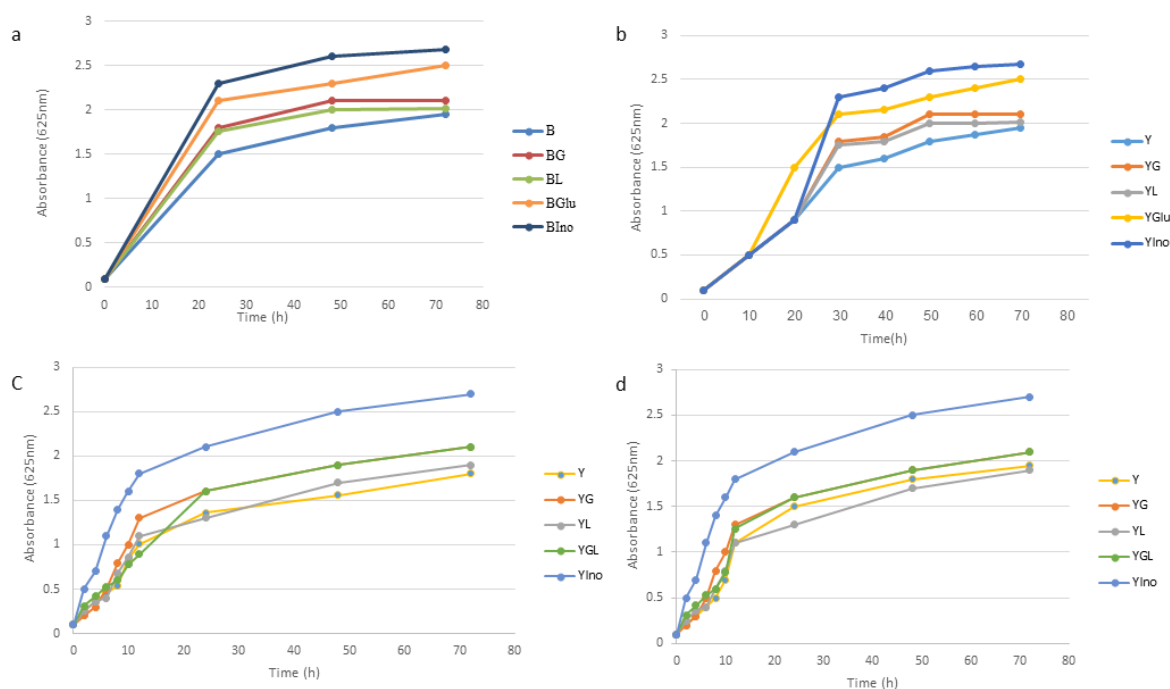
جدول ۷- مقایسه کمی پارامترهای رشد تحت تأثیر تیمارهای مختلف

Table 7- Quantitative comparison of growth parameters affected by different treatments

نمونه Sample	تیمار Treatment	نرخ رشد Slope	حداکثر OD Max OD
سویه استاندارد باکتریایی Standard strain of bacterial	GL	0.021 ± 0.001	0.85 ± 0.03
	Ino	0.018 ± 0.002	0.78 ± 0.02
	G	0.015 ± 0.001	0.68 ± 0.01
	L	0.014 ± 0.001	0.65 ± 0.02
سویه استاندارد مخمر Standard strain of yeast	GL	0.024 ± 0.002	0.82 ± 0.03
	Ino	0.019 ± 0.001	0.74 ± 0.02
	G	0.016 ± 0.001	0.63 ± 0.01
	L	0.015 ± 0.001	0.61 ± 0.01
جدایه A3 Isolate A3	GL	0.023 ± 0.002	0.80 ± 0.02
	Ino	0.018 ± 0.001	0.72 ± 0.02
	G	0.015 ± 0.001	0.64 ± 0.01
	L	0.014 ± 0.001	0.62 ± 0.01
جدایه A10 Isolate A10	GL	0.022 ± 0.001	0.79 ± 0.02
	Ino	0.017 ± 0.001	0.70 ± 0.01
	G	0.014 ± 0.001	0.61 ± 0.01
	L	0.013 ± 0.001	0.59 ± 0.01

* (G): پلی ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم، L: پلی ساکاریدهای لنتینولا ادودس، GL: گلوکز و Ino: اینولین

*(G: *Ganoderma lucidum* polysaccharides, L: *Lentinula edodes* polysaccharides, GL: Glucose and Ino: Inulin)



شکل ۵- تأثیر پری بیوتیک ها بر رشد a. سویه استاندارد پروبیوتیک باکتریایی، b. سویه استاندارد پروبیوتیک مخمر، c. جدایه A3، d. جدایه A10

(B: باکتری، Y: مخمر، G: پلی ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم، L: پلی ساکاریدهای لنتینولا ادودس، GL: گلوکز و Ino: اینولین)

Fig. 5. Effect of prebiotics on the growth of a. Standard strain of bacterial probiotic, b. Standard strain of yeast probiotic, c. Isolate A3, d. Isolate A10 (B: bacteria, Y: yeast, G: *Ganoderma lucidum* polysaccharides, L: *Lentinula edodes* polysaccharides, GL: Glucose and Ino: Inulin)

بحث

گزارش های قبلی مبنی بر مزایای سویه های بومی می باشد. پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های غیر بیماری زا با خواص سلامت بخش قابل توجه هستند که از منابع مختلفی از جمله مواد غذایی تخمیری و لبنی جداسازی می شوند (Baenas et al., 2024; Roberfroid,)

مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از جدایه های بومی، به دلیل سازگاری بیشتر با میکروبیوتای منطقه ای، می تواند اثربخشی بالاتری نسبت به سویه های تجاری داشته باشد، که این موضوع مطابق با

مرتبط با چاقی بررسی گردید و تأثیر پری‌بیوتیک‌ها بر افزایش باکتری‌های مفید مانند گونه‌های بیفیدوباکتر و آکرمانسیا^۴ که نقش مهمی در سلامت متابولیک دارند را تأیید نمود (Delzenne & Bindels, 2015).

این مطالعه با تمرکز بر بررسی اثرات پری‌بیوتیکی پلی‌ساکاریدهای قارچ‌های گانودرما لوسیدوم و لنتینولا/دودس بر جدایه‌های پروبیوتیکی بومی از نمونه‌های لبنی، نوآوری قابل توجهی در حوزه سلامت و تغذیه ایجاد کرده‌است. برخلاف اکثر مقالات که عمدتاً به بررسی خواص پروبیوتیک‌ها یا پری‌بیوتیک‌های تجاری مانند اینولین پرداخته‌اند، این پژوهش به شناسایی و ارزیابی ترکیبات طبیعی و کمتر شناخته شده‌ای پرداخته که علاوه بر اثرات پری‌بیوتیکی، خواص آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به نمونه‌های تجاری دارند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ترکیب جدایه‌های پروبیوتیکی بومی با پلی‌ساکاریدهای قارچی می‌تواند منجر به توسعه محصولات سین‌بیوتیک طبیعی و مقرون‌به‌صرفه با اثرات سلامت‌بخش بالاتر شود. این نوآوری، علاوه بر تأکید بر کاربردهای عملی، نیاز به مطالعات تکمیلی در مدل‌های حیوانی و انسانی را نیز برجسته می‌کند که می‌تواند مسیر تحقیقات آینده را به سمت کاربردهای بالینی و تجاری هموار سازد.

نتیجه‌گیری

چهار جدایه با توان پروبیوتیکی بالا (دو جدایه مخمری و دو جدایه باکتریایی) از ۲۰ نمونه محصولات لبنی سنتی و صنعتی شناسایی شدند. به‌دنبال بررسی خواص بیوشیمایی و مولکولی این ۴ جدایه بومی، A3 و A10 به ترتیب سویه‌ای از ساکارومایسس سرویزیه و کاندیدا ترئوپیکالیس و جدایه‌های باکتریایی B1 و B3 به ترتیب لاکتوباسیلوس کازئی و سویه‌ای از لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس شناسایی شدند و می‌توان آن‌ها را با انجام آزمایشات دیگر به‌عنوان یک محصول پروبیوتیک بومی معرفی نمود. بر اساس داده‌های به‌دست‌آمده، رشد جدایه‌های پروبیوتیکی در حضور پلی‌ساکاریدهای قارچی در برخی موارد تا ۱۰٪ بیشتر از اینولین (پری‌بیوتیک تجاری) در ۱۲ ساعت مشاهده شد که از نظر آماری معنادار بود ($P < 0.05$)، به همین ترتیب می‌توان بیان نمود که پلی‌ساکاریدهای جدا شده قابلیت پری‌بیوتیکی قابل مقایسه و حتی بهتر از اینولین (پری‌بیوتیک تجاری) دارا می‌باشند. همچنین نتایج حاصل از بررسی خصوصیات عملکردی پلی‌ساکاریدهای جدا شده، نشان می‌دهند که این ترکیبات فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به اینولین و تجزیه‌پذیری قابل قبولی در درمان اسیدی و آنزیمی را دارا هستند. براساس نتایج این مطالعه پلی‌ساکاریدهای جدا شده با دارا بودن

(2000). با گسترش دانش در این حوزه، پری‌بیوتیک‌ها نیز به‌عنوان ترکیبات غیرقابل هضم که به‌صورت انتخابی توسط میکروبیوتا مصرف می‌شوند و اثرات مفیدی بر سلامت دارند، مورد توجه قرار گرفتند (Baenas et al., 2024). پری‌بیوتیک‌ها ترکیبات غیر قابل هضمی هستند که به‌صورت انتخابی مورد استفاده میکروبیوتا قرار گرفته و اثرات مفیدی بر سلامتی می‌گذارند (Baenas et al., 2024; Roberfroid, 2000). قارچ‌ها از جمله منابع قابل توجه پری‌بیوتیک‌ها هستند (Huchchannanavar, Hasan, Kumar, & Gupta, 2024). از جمله این منابع پلی‌ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم و لنتینولا/دودس هستند که با دارا بودن خواص ضد سرطانی و تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی، منجر به افزایش کیفیت زندگی می‌گردند و از همین رو اهمیت بالایی دارند (Alinia-Ahandani, Fazilati, Alizadeh, & Boghozian, 2018; Muszyńska, Pazdur, Lazur, & Sułkowska-Ziaja, 2017). استفاده از ترکیبات طبیعی، در دسترس، ارزان قیمت و بدون عوارض جانبی نظیر پلی‌ساکاریدهای قارچی که خواص درمانی داشته‌باشند، می‌تواند رویکردی ارزشمند در بهبود سلامت باشد (Gao et al., 2002). در مطالعه‌ای الیگوساکاریدهای استخراج شده از پلی‌ساکارید اسپورودرم گانودرما لوسیدوم در مقایسه با گروه کنترل در تخمیر میکروبیوتای روده، فراوانی برخی از باکتری‌های مفید افزایش و برخی از باکتری‌های مضر را کاهش داد (Yang et al., 2020). همچنین، پلی‌ساکارید مستخرج شده از اندام میوه‌ای گانودرما لوسیدوم با غنی‌سازی ویژه با باکترئیدس/اوتوس^۱ و باکترئیدس یونیفورمیس^۲ در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که پلی‌ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم تنوع میکروبی و نسبت باکتری‌ها به فیرمیکوت‌ها^۳ را بهبود بخشیده و باکترئیدس/اوتوس و باکترئیدس یونیفورمیس را به شدت غنی کرده‌است (Yang et al., 2022). در مطالعه‌ای دیگر، اثرات هتروپلی‌ساکارید مستخرج شده از اندام میوه‌ای لنتینولا/دودس بر پاسخ ایمنی موش‌های مسن ارزیابی گردید و نشان داده شد که بر افزایش ایمنی و بهبود سلامت روده اثرات مفیدی داشته است (Xu et al., 2015). در مطالعه‌ای، خواص بیفیدوژنیک و تأثیر تخمیر بیفیدوباکتریایی بر مولکول‌ها و فعالیت‌های ایمنی پلی‌ساکاریدهای لنتینولا/دودس ارزیابی گردید. تخمیر بیفیدوباکترها باعث کاهش قابل توجه وزن مولکولی هر دو بخش پلی‌ساکاریدهای لنتینولا/دودس و منجر به فعالیت تحریک‌کننده سیستم ایمنی بالاتر در سلول‌های ماکروفاژ RAW 264.7 گردید (Huang et al., 2024). همچنین، اهمیت استفاده از پلی‌ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم به‌عنوان پری‌بیوتیک‌های طبیعی برای پیشگیری و درمان اختلالات متابولیک

3- Firmicutes

4- Akkermansia sp.

1- Bacteroides ovatus

2- Bacteroides uniformis

خصوصیات زیست‌فعالی، می‌توانند گزینه مناسبی برای بهبود کیفیت مواد غذایی و افزایش اثرات سلامتی بخش آن‌ها باشند. به‌منظور ارزیابی جامع‌تر و دقیق‌تر اثرات بالینی این ترکیبات، انجام مطالعات تکمیلی شامل بررسی جذب زیستی، آزمون‌های ایمنی و تحلیل پاسخ‌های ایمنی موضعی در مدل‌های حیوانی و انسانی اکیداً توصیه می‌شود.

مشارکت نویسندگان

محدثه لاری پور: مدیریت پروژه، مدیریت داده‌ها، تحلیل رسمی، نظارت و نوشتن - بررسی و ویرایش. **ندا جامعی:** تحقیق و بررسی، روش‌شناسی، مفهوم‌سازی و منابع. **حورا دادگستر:** تحقیق و بررسی و نوشتن - پیش‌نویس اصلی. **جمیله نوروزی:** نظارت و اعتبارسنجی.

منابع تأمین مالی

این تحقیق هیچ کمک مالی خاصی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیر انتفاعی دریافت نکرد.

سپاسگزاری

از کلیه مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال بالخصوص دانشکده علوم زیستی که در انجام فعالیت‌ها و امور آزمایشگاهی این تحقیق، کمال همکاری و مساعدت را مبذول فرموده اند، سپاسگزاری می‌گردد.

فهرست علائم اختصاری

L. edodes: *Lentinula edodes*
G. lucidum: *Ganoderma lucidum*
B: bacteria
A and Y: yeast
G: *Ganoderma lucidum* polysaccharides
L: *Lentinula edodes* polysaccharides
GL: Glucose
Ino: Inulin
PCR: Polymerase Chain Reaction
OD: Optical density
FT-IR: Fourier Transform Infrared Spectrometer

References

- Alinia-Ahandani, E., Fazilati, M., Alizadeh, Z., & Boghoshian, A. (2018). The introduction of some mushrooms as an effective source of medicines in Iran Northern. *Biology and Medicine*, 10(5), 1-5. <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000451>
- Appanna, V.D., & Appanna, V.D. (2018). Dysbiosis, probiotics, and prebiotics: in diseases and health. *Human Microbes-The Power within: Health, Healing and Beyond*, 81-122. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7684-8_3
- Astashkina, A.P., Khudyakova, L., & Kolbysheva, Y.V. (2014). Microbiological quality control of probiotic products. *Procedia Chemistry*, 10, 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.10.014>
- Baenas, I., Camacho-Barcia, L., Miranda-Olivos, R., Solé-Morata, N., Misiólek, A., Jiménez-Murcia, S., & Fernández-Aranda, F. (2024). Probiotic and prebiotic interventions in eating disorders: A narrative review. *European Eating Disorders Review*, 32(6), 1085-1104. <https://doi.org/10.1002/erv.3069>
- Bisen, P., Baghel, R.K., Sanodiya, B.S., Thakur, G.S., & Prasad, G. (2010). *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry*, 17(22), 2419-2430. <https://doi.org/10.2174/092986710791698495>
- Cappuccino, J.G., & Sherman, N. (2013). *Microbiology: a laboratory manual*: Pearson Higher Ed.
- Chen, Z., & Zhang, H. (2025). The interaction between *Ganoderma lucidum* polysaccharides and gut microbiota: Implications for immune health. *Medicinal Plant Research*, 15. <https://doi.org/10.5376/mpr.2025.15.0001>
- Chou, W.T., Sheih, I.C., & Fang, T.J. (2013). The applications of polysaccharides from various mushroom wastes as prebiotics in different systems. *Journal of Food Science*, 78(7), M1041-M1048. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12160>
- Cook, A., & Gilbert, R. (1969). The effect of sodium chloride on heat resistance and recovery of heated spores of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 32(1), 96-102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1969.tb02193.x>
- Delzenne, N.M., & Bindels, L.B. (2015). *Ganoderma lucidum*, a new prebiotic agent to treat obesity? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(10), 553-554. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.137>
- Diosma, G., Romanin, D.E., Rey-Burusco, M.F., Londero, A., & Garrote, G.L. (2014). Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 43-53. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1419-9>
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E. (2006). *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria* (Vol. 1): Springer. <https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x>

13. Fan, H., Mazza, G., & Liao, X. (2010). Purification, composition and antioxidant activity of polysaccharides from wolfberry, cherry, kiwi and cranberry fruits. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 2(1), 9-17.
14. Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109(S2), S35-S50. <https://doi.org/10.1017/S0007114512004011>
15. Gao, Y., Zhou, S., Chen, G., Dai, X., & Ye, J. (2002). A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. Extract (Ganopofy) in patients with advanced cancer. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4(3). <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v4.i3.30>
16. Giavasis, I. (2014). Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 162-173. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.010>
17. Gomes, A.M., & Malcata, F.X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10(4-5), 139-157. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00033-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00033-3)
18. Hearst, R., Nelson, D., McCollum, G., Millar, B.C., Maeda, Y., Goldsmith, C.E., & Moore, J.E. (2009). An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 15(1), 5-7. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2008.10.002>
19. Holscher, H.D. (2017). Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*, 8(2), 172-184. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1290756>
20. Huang, L.X., Gu, F.T., Zhu, Y.Y., Zhao, Z.C., Li, J.H., & Wu, J.Y. (2024). Bifidogenic properties of polysaccharides isolated from mushroom *Lentinula edodes* and enhanced immunostimulatory activities through Bifidobacterial fermentation. *Food Bioscience*, 62, 105121. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105121>
21. Huchchannanavar, S., Hasan, W., Kumar, D., & Gupta, S. (2024). Prebiotic potential of mushroom-derived compounds. In *Mushroom Magic* (pp. 228-243): CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003570257-14>
22. Jain, S.K., Jain, A., Gupta, Y., & Ahirwar, M. (2007). Design and development of hydrogel beads for targeted drug delivery to the colon. *Aaps Pharmscitech*, 8(3), 56. <https://doi.org/10.1208/pt0803056>
23. Lindequist, U. (2024). Medicinal mushrooms as multicomponent mixtures—demonstrated with the example of *Lentinula edodes*. *Journal of Fungi*, 10(2), 153. <https://doi.org/10.3390/jof10020153>
24. Madigan, M., Bender, K., Buckley, D., Sattley, W., & Stahl, D. (2018). Brock biology of microorganisms 15th edn, 71-74. In: Pearson Higher Ed.
25. Manzanares, W., Lemieux, M., Langlois, P.L., & Wischmeyer, P.E. (2016). Probiotic and synbiotic therapy in critical illness: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care*, 20, 1-19. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1434-y>
26. Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.-I., & Lee, Y.C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 69-72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>
27. Mohanty, D., & Ray, P. (2016). Evaluation of probiotic and antimicrobial properties of lactobacillus strains isolated from dairy products. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 230-234. <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2016v8i11.12683>
28. Moradali, M.F., Hedjaroude, G.A., Mostafavi, H., Abbasi, M., Ghods, S., & Sharifi-Tehrani, A. (2007). The genus *Ganoderma* (Basidiomycota) in Iran. *Mycotaxon*, 99, 251-270. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v7.i4.70>
29. Muszyńska, B., Pazdur, P., Lazur, J., & Sułkowska-Ziaja, K. (2017). *Lentinula edodes* (Shiitake)—biological activity. *Medicina Internacia Revuo*, 28(108), 189-195.
30. Nielsen, S.S. (2009). Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates. In *Food analysis laboratory manual* (pp. 47-53): Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_6
31. Norajit, K., Kim, K.M., & Ryu, G.H. (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, 98(3), 377-384. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.015>
32. Pandey, K., Naik, S., & Vakil, B. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577-7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>
33. Raghukumar, C. (2008). Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. *Fungal Diversity*, 31, 19-35.
34. Ren, G., Xu, L., Lu, T., & Yin, J. (2018). Structural characterization and antiviral activity of lentinan from *Lentinus edodes* mycelia against infectious hematopoietic necrosis virus. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 1202-1210. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.132>
35. Roberfroid, M.B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1682S-1687S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1682S>

36. Roustae, N., Aslan, M., Yesilcimen Akbas, M., Ozcan, F., Sar, T., & Taherzadeh, M.J. (2024). Effects of fungal based bioactive compounds on human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(20), 7004-7027. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2178379>
37. Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.-M., & Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.014>
38. Stamets, P. (2011). *Growing gourmet and medicinal mushrooms*: Ten speed press.
39. Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěvák, J., Erban, V., & Čopíková, J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 548-556. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.021>
40. Umu, Ö.C., Rudi, K., & Diep, D.B. (2017). Modulation of the gut microbiota by prebiotic fibres and bacteriocins. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 28(1), 1348886. <https://doi.org/10.1080/16512235.2017.1348886>
41. Wayne, P. (2010). Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI)(2020) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Background, Organization, Functions, and Processes. *Journal Clinical Microbiology*, 58(3), 01864-0186419. <https://doi.org/10.1128/jcm.01864-19>
42. Xu, X., Yang, J., Ning, Z., & Zhang, X. (2015). *Lentinula edodes*-derived polysaccharide rejuvenates mice in terms of immune responses and gut microbiota. *Food & Function*, 6(8), 2653-2663. <https://doi.org/10.1039/C5FO00689A>
43. Yang, K., Zhang, Y., Cai, M., Guan, R., Neng, J., Pi, X., & Sun, P. (2020). In vitro prebiotic activities of oligosaccharides from the by-products in *Ganoderma lucidum* spore polysaccharide extraction. *RSC Advances*, 10(25), 14794-14802. <https://doi.org/10.1039/C9RA10798C>
44. Yang, L., Kang, X., Dong, W., Wang, L., Liu, S., Zhong, X., & Liu, D. (2022). Prebiotic properties of *Ganoderma lucidum* polysaccharides with special enrichment of *Bacteroides ovatus* and *B. uniformis* in vitro. *Journal of Functional Foods*, 92, 105069. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105069>
45. Yin, C., Li, C., Ma, K., Fan, X., Yao, F., Shi, D., & Gao, H. (2023). The physicochemical, antioxidant, hypoglycemic and prebiotic properties of γ -irradiated polysaccharides extracted from *Lentinula edodes*. *Food Science and Biotechnology*, 32(7), 987-996. <https://doi.org/10.1007/s10068-022-01234-5>
46. Zarmi, A.H., Tasharofi, Z., Alvandi, H., Barshan-tashnizi, M., Ebrahimi-Hosseinzadeh, B., & Hosseini, Z.B.M. (2022). A kinetic modeling of growth and mycelial exopolysaccharide production by *Lentinus edodes* (Shiitake edible mushroom): Enhancemet of production in volatile co-cultures for shiitake edible mushroom. *Applied Food Biotechnology*, 9(1), 67-78. <https://doi.org/10.17474/artvinofd.953998>
47. Zhao, J., Zhao, J., Zang, J., Peng, C., Li, Z., & Zhang, P. (2024). Isolation, identification, and evaluation of lactic acid bacteria with probiotic potential from traditional fermented sour meat. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1421285. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1421285>
48. Zhao, L., Dong, Y., Chen, G., & Hu, Q. (2010). Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 783-789. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.029>
49. Zheng, M., Pi, X., Li, H., Cheng, S., Su, Y., Zhang, Y., & Jiang, Y. (2024). *Ganoderma* spp. polysaccharides are potential prebiotics: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(4), 909-927. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2110035>