تشخیص *باسیلوس کواگولانس* در محصولات پروبیوتیک به روش مولکولی PCR

فریما معتضدی[a]، هوشنگ نیکوپور[b]، محمد حسن شاه حسینی[c*]

[a] *کارشناس ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*
[b] *دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*
[c] *دانشیار گروه میکروبیولوژی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*

Archive of SID

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۳/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۹/۲۳

چکیده

مقدمه: پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر در مقادیر کافی تجویز گردند اثرات مفید سلامتی بر روی میزبان خواهند داشت. *باسیلوس کواگولانس* یک باکتری پروبیوتیکی گرم مثبت، هوازی تا غیر هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و تولید کننده اندوسپور می باشد. هدف از این مطالعه شناسایی سریع مولکولی *باسیلوس کواگولانس* در محصولات پروبیوتیک است که طبق اطلاعات روی برچسب حاوی این باکتری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: با استفاده از سوش استاندارد *باسیلوس کواگولانس* آزمون PCR بهینه گردید. حد تشخیص و ویژگی آزمون با استفاده از DNA این باکتری بررسی شد. تعداد ۷ نمونه محصول پروبیوتیک موجود در بازار ایران جمع‌آوری و روش‌های مختلف استخراج DNA از این محصولات بهینه و *باسیلوس کواگولانس* از طریق PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: آزمونPCR بهینه و محصولBase pair ۴۵۰ (جفت باز) در ژل آگارز ۱/۵ درصد مشاهده شد، حد تشخیص در این مطالعه ۱۰۰۰ DNAباکتری در آزمون PCR بدست آمد و با هیچ DNA دیگری در آزمون ویژگی تکثیر نگردید. در تمامی محصولات پروبیوتیک ادعا شده حامل *باسیلوس کواگولانس*، این باکتری مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش که وجود *باسیلوس کواگولانس* در تمام نمونه‌ها مشخص شد، می‌توان نتیجه گرفت که PCR روشی سریع و مطمئن جهت شناسایی این میکروارگانیسم در محصولات پروبیوتیک می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس کواگولانس، پروبیوتیک، PCR*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: shahhosseiny@yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی حاوی میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که برای سلامتی میزبان مفید می‌باشد. بر اساس تعریف جدید ارائه شده توسط WHO/FAO پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر در مقادیر کافی تجویز گردند اثرات مفید سلامتی بر روی میزبان خواهند داشت. باکتری‌های اسیدلاکتیک و بیفیدوباکتریوم‌ها میکروب‌های متداولی هستند که به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند. با وجود این مخمرها و باسیل‌های خاصی نیز به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند (همایونی‌راد و همکاران، ۱۳۸۷). باکتری‌های اسپوردار پروبیوتیکی به عنوان دارو و مکمل‌های غذایی حیوانات، آبزیان و رژیم غذایی انسان‌ها استفاده می‌شوند. اسپورهای مقاوم به حرارت، چندین مزیت نسبت به گونه‌های بدون اسپور مانند گونه‌های لاکتوباسیلوس دارند. مزیت اول اینکه آنها در حالت خشک بدون تغییر در زنده مانی در دمای اتاق قابل نگهداری هستند و مزیت دوم توانایی زنده مانی آنها در pH پایین معده است (Cuttin *et al*., 2011). *باسیلوس کواگولانس*[1] یک پروبیوتیک تولید کننده اسپور است و اسپور در مقابل حرارت و فشار در فرایند تولید، از سلول محافظت کرده و پایداری آن را هنگام گذشتن از دستگاه گوارش در برخورد با اسید معده و صفرا حفظ میکند. این اسپور با رسیدن به روده کوچک شروع به تندش کرده و یک باکتری جدید تولید میکند. مقاومت و پایداری بالای اسپور این باکتری در مقابل حرارت، فشار و اسید باعث میشود آن را به عنوان یک انتخاب مناسب برای استفاده در محصولات غیر لبنی در مقایسه با دیگر گونه‌ها برگزینیم. حضور این باکتری در دستگاه گوارش باعث کاهش روزانه حرکات روده می‌شود (گنجوری و همکاران، ۱۳۹۱). *باسیلوس کواگولانس* یک باکتری گرم مثبت، هوازی تا بی هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و تولید کننده اندوسپور می باشد(Keller *et al*., 2011). واژه پروبیوتیک در تحولات قرن بیستم از فرضیه‌ای که توسط دانشمندان روسی الی مچنیکف جایزه نوبل دریافت کرد، مطرح شد. وی بیان کرد که دلیل سلامت و طول عمر بالای روستایی‌ها و عشایر، مصرف محصولات لبنی تخمیری می‌باشد. وی معتقد بود که در هنگام مصرف لاکتوز باسیلوس‌ها به طور مثبتی میکرو فلور روده را تحت تاثیر قرار داده و فعالیت‌های میکروبی و مضر را کاهش می دهند (Rivera *et al*., 2010) تشخیص *باسیلوس کواگولانس* در محصولات پروبیوتیک توسط روش‌های کلاسیک و بر حسب مشاهده میکروسکوپی و کشت نمونه‌های به دست آمده حاصل از محصولات پروبیوتیک قابل انجام است که با توجه به محدودیت‌های این روش‌ها و طولانی بودن مراحل انجام تست و آنالیز نتایج و عدم قطعیت نتایج به دست آمده برای تشخیص سریع‌تر و دقیق‌تر *باسیلوس کواگولانس* می توان از تکنیک‌های موثر مولکولی مانند PCR[2] بهره جست. استفاده از روش PCR می‌تواند تحولی در سرعت بخشیدن به تشخیص *باسیلوس کواگولانس* موجود در محصولات پروبیوتیک ایجاد نماید (Keller *et al*., 2012).

هدف از این پژوهش تشخیص ملکولی *باسیلوس کواگولانس* در محصولات پروبیوتیک به روش مولکولی PCR است.

مواد و روش‌ها

- استخراج DNA ازقرص لاکتول حاوی *باسیلوس کواگولانس*:

قرص لاکتول (حاوی باکتری استاندارد *باسیلوس کواگولانس*) تهیه، سوسپانسیون و سپس به مدت ۳۰ دقیقه Boil شد. محلول حاصل در محیط کشت نوترینت آگار و محیط LB کشت داده شد. از کشت حاصل به روش جوشاندن و کیت DNG.Plus (سیناژن) اسید نوکلئیک استخراج و به عنوان کنترل مثبت برای بهینه کردن واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

- بهینه نمودن آزمون PCR

پس از بهینه کردن آزمون PCR از جهت اجزا و پروفایل حرارتی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *COMK* طبق برنامه حرارتی مناسب، یک دور PCR در مورد آنها اجرا شد و DNA سویه استاندارد در کنار نمونه کنترل منفی و در کنار سایز مارکر بر روی ژل آگارز

[1] *Bacillus coagulans* [2] Polymerase Chain Reaction

Archive of SID

www.SID.ir

(invitrogene) ۱/۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بهینه نمودن از گرادیانت (دستگاه ترموسایکلر کمپانی LONG GENE مدل 965MG) و در یک بازه دمایی ۱۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده از تارگت ژن COMK استفاده گردید (جدول ۱).

- بررسی محصول PCR

جهت آشکارسازی محصول PCR یـا آمپلیکـون، روش متـداول و سـریع الکتروفـورز ژل آگـارز و رنـگ‌آمیـزی بـا SYBR Safe (سینا کلون) استفاده شد.

- تعیین حد تشخیص (LOD) و ویژگی

با استفاده از DNA *باسیلوس کواگولانس* که میزان غلظت آن با دستگاه نانودراپ اندازه گرفته شده بود و تعداد کپی نامبر آن از طریق فرمول Genome Copy Number (GCN) مشخص شده بود استفاده گردید. از DNA مورد نظر با غلظت مشخص، رقت‌های مختلف به روش کخ تهیه کرده و آزمون PCR در کنار کنترل مثبت و منفی بر روی آنها گذاشته شد.

برای تایید ویژگی آزمون PCR، ازDNAهای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدو باکتریوم بیفیدوم، ساکارومایسز سرویزیه، باسیلوس سوبتیلوس، لاکتوباسیلوس رامناسوس، لاکتوباسیلوس کازئی*،DNA انسان به همراه نمونه‌های کنترل مثبت و منفی تست PCR انجام شد.

- جمع‌آوری نمونه

تعداد ۷ نمونه محصول پروبیوتیک (گز، عسل، ماکارونی، بیسکوئیت، نان، کیک) مدعی حاوی *باسیلوس کواگولانس* با برندهای مختلف از فروشگاه‌ها و خرده‌فروشی‌ها ایران جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید.

- استخراج نمونه ها و تست PCR

استخراج DNA از نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از روش جوشاندن و DNG صورت گرفت و تست PCR بهینه بر روی نمونه‌ها انجام گرفت. به این صورت که ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه، سپس ۶۰۰ ماکرو لیتر آب ۲ بار تقطیر شده اضافه و ورتکس گردید (چند دقیقه هر نمونه ورتکس شد تا باکتری از بافت آن جدا شود). سپس مدتی لوله‌ها بدون حرکت گذاشته شد تا تکه‌های بزرگ ته نشین شوند. مایع رویی به آرامی کشیده و در لوله جدید ریخته شد. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. مایع رویی تخلیه و Pellet در ۱۰۰ ماکرولیتر آب ۲ بار تقطیر شده حل گردید، سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای جوش قرار داده شد.

یافته‌ها

- بهینه نمودن آزمون PCR

پس از بهینه کردن آزمون PCR از جهت اجزا و پروفایل حرارتی با دمای چسبیدن ۶۲ درجه سانتی‌گراد با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *COMK*، طبق برنامه حرارتی مناسب، یک دور PCR در مورد آنها اجرا شد و DNA *باسیلوس کواگولانس* در کنار نمونه کنترل منفی و سایز مارکر 50bp DNA Ladder (Thermoscientific) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. در الکتروفورز محصول PCR، باند اختصاصی حاصل از آمپلیکون مورد نظر (۴۵۰جفت باز) قابل رویت بود (شکل ۱).

- تعیین حد تشخیص (LOD) آزمون PCR

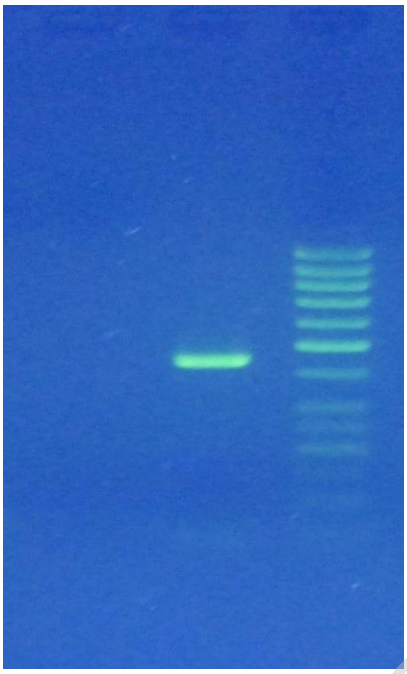
آزمون حد تشخیص PCR با تهیه رقت‌های متوالی از DNA *باسیلوس کواگولانس* با استفاده از پرایمر ژن COMK انجام گرفت که نتایج آزمون حد تشخیص آزمون PCRنشان داد که با وجود ۱۰۰۰ کپی از DNA در یک آزمون PCR، تکثیر انجام می‌گیرد و در تیترهای کمتر از ۱۰۰۰ کپی از DNA، باندی مشاهده نشد (شکل ۲).

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در تست تشخیص PCR (Johanson *et al.*, 2015)

ژن هدف	نام پرایمر	توالی پرایمر
COMK	FBCOA450	5-: GATCATTTTCTTCCATGGTATG -3
	RBCOA450	5- GAAACGATGGCGCTGGATAC -3

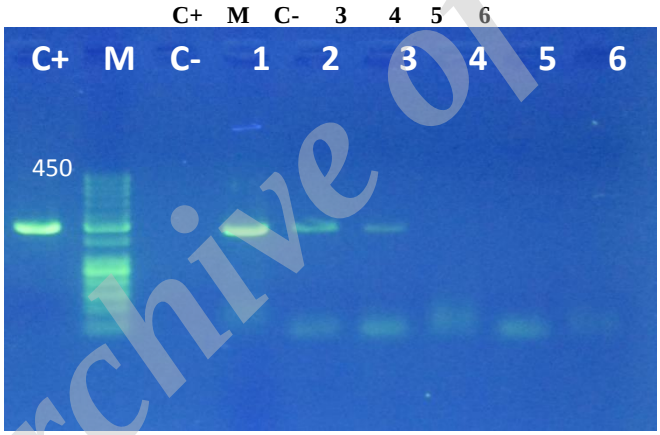
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- بهینه کردن آزمون PCR برای تشخیص *باسیلوس کواگولانس*

M: سایز مارکر 50bp DNA Ladder C- : کنترل منفی C+: کنترل مثبت (٤٥٠جفت باز محصول)



شکل ۲- نتایج آزمون حد تشخیص آزمونPCR

C+: نمونه کنترل مثبت *M*: سایز مارکر 50bp DNA Ladder C-: کنترل منفی

۱: تست PCR مثبت با 100 000 ژنوم ، ۲: تست PCR مثبت با 10 000ژنوم ، ۳: تست PCR مثبت با 1000، ٤: تست PCR با 100 ژنوم ، ٥: تست PCR با 10 ژنوم، ٦: تست PCR با 1 ژنوم

Archive of SID

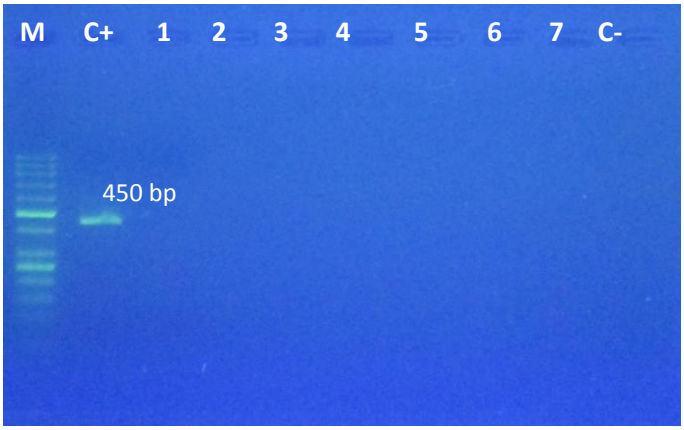
- تعیین ویژگی تست PCR

نتایج نشان دادند که آزمون PCR بهینه شده از اختصاصیت بسیار بالایی برخوردار است، بطوریکه فقط با DNA باکتری *باسیلوس کواگولانس* واکنش نشان داد و با DNA سایر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه هیچ واکنشی صورت نگرفت (شکل ۳).

- نتایج تست PCR بر روی نمونه‌های حاوی باسیلوس کواگولانس

در این مطالعه ۷ نمونه از محصولات پروبیوتیک (باسیلوس *کواگولانس*) ، شامل انواع نمونه‌های گز، کیک، ماکارونی، عسل، بیسکوئیت به مدت ۴ ماه جمع‌آوری شدند. شکل۴ نتیجه آزمون PCR، در تعدادی از نمونه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. کنترل‌های مثبت و منفی واکنش PCR صحت نتایج مطالعه را تایید کردند.

www.SID.ir



شکل ۳- تست PCR برای ویژگی *باسیلوس کواگولانس*

سایز مارکر:(Thermo Scientific COT:SM۰۳۷۱) 50 bp DNA Ladder

C-: کنترل منفی C+:کنترل مثبت

۱: DNA باکتری Lactobacillus acidophilus

۲ : DNA باکتری: Bifidobacterium bifidum

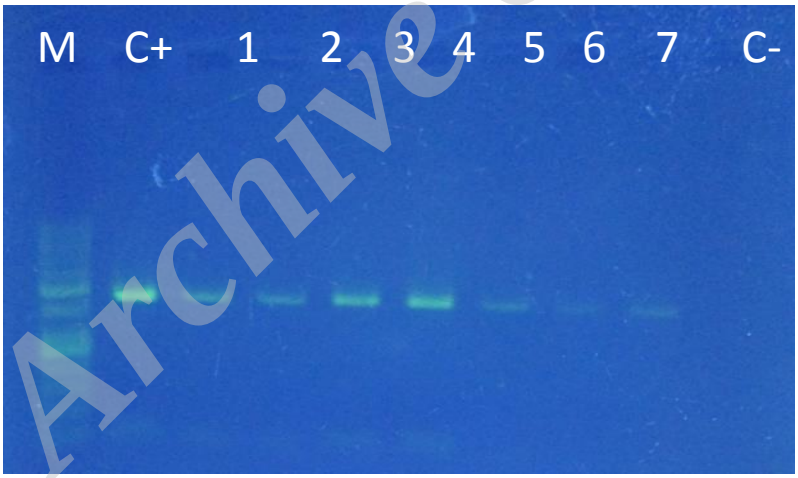
۳ : مخمر Saccharomycec cerevisiae

٤: Bacillus subtilis

٥: Lactobacillus ramnosus

٦: Lactobacillus casei

۷: Human DNA



شکل٤- نتیجه تست PCR بر روی نمونه ها

M سایز مارکر:(Thermo Scientific COT:SM۰۳۷۱) 50 bp DNA Ladder

C - : کنترل منفی C+:کنترل مثبت

۱ تا ۷:نمونه های مثبت حاوی باسیلوس کواگولانس

بحث

به دلیل مشکلات بسیار زیاد گوارشی، سرطان، مشکلات قلبی و عروقی، اسهال و... برای درمان و پیشگیری آنها استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک بسیار حائز اهمیت است از جمله باکتری پروبیوتیکی که مقاوم به شرایط بدن باشد و بتواند زنده بماند و اثر پروبیوتیکی خود رابه میزبان منتقل کند، می‌توان به باکتری *باسیلوس کواگولانس* که باکتری اسپوردار است اشاره کرد این باکتری می‌تواند دمای بالا را تحمل کند. در سال ۲۰۱۱ Endres و همکاران تحقیقی را برای ارزیابی ایمنی مکمل

Archive of SID

www.SID.ir

پروبیوتیکی که حاوی *باسیلوس کواگولانس* بود انجام دادند. بعضی از گونه‌های *باسیلوس کواگولانس* در مقابل حرارت، اسید معده و صفرا مقاوم می باشند. این در حالی است که بسیاری از باکتری‌های پروبیوتیکی به این شرایط حساس هستند و این توانایی را ندارند. در این تحقیق چندین بررسی سم شناسی انجام شد که شامل بررسی آزمایشگاهی جهت معکوس و انحراف کروموزومی، ارزیابی میکرونوکلئاز در موش، ارزیابی اثرات مصرف خوراکی، به مدت ۹۰ روز در موش به صورت ACUTE، ارزیابی رقت‌های مصرف به صورت ACUTE و مطالعه التهاب چشم و پوست در خرگوش بودند. نتایج این ارزیابی ایمنی سم شناسی نشان داد که *باسیلوس کواگولانس* غیر جهش‌زا و غیر موثر در تغییر ژنی است. علاوه بر این مصرف خوراکی ۹۰ روزه آن را ایمن تشخیص داد و میزان مصرف آن را برای بزرگسالان از ۱۰۰ پیشنهاد کرد (Endres *et al*., 2011).

نتایج حاصل از این پژوهش وجود این باکتری در محصولات خریداری شده را با استفاده از روش مولکولی PCR به اثبات رسانید که نشان دهنده مقاومت بالای این باکتری نسبت به حرارت در محصولات غیر لبنی بوده که به دلیل وجود اسپور در آن است. *باسیلوس کواگولانس*، به دلیل ماهیت تولید کننده اسپوری که دارد، در برابر اکثر شرایط شیمیایی و فیزیکی مثل حرارت و گرما مقاوم است و در حین فرآیند تولید، حمل و نقل و نگهداری زنده می‌ماند و تعداد *باسیلوس کواگولانس* زیستا دستخوش تغییر نمی‌شود. *باسیلوس کواگولانس* نیازی به شرایط نگهداری در یخچال ندارد و در دمای اتاق پایدار است. پودر لاکتوسپور تولیدی در هر گرم حاوی ۱۵ بیلیون اسپور است. مقادیر کمتر اسپور, برای مثال ۶ بیلیون اسپور در هر گرم، نیز تولید می‌گردد (Kamarei, 2012). یکی از مشکلات عمده در صنعت لبنیات کشور در خصوص تولید محصولات پروبیوتیک، کاهش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در محصولات لبنی همچون ماست و پنیر پس از تولید تا زمانی که محصول توسط مصرف کننده مواد غذایی به مصرف می‌رسد می‌باشد. مهمترین باکتری‌هایی که در مواد غذایی استفاده می‌گردد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدو باکتریوم* هستند که به صورت چشمگیری به دلیل حساسیت بالابه شرایط مواد غذایی در طی دوره نگهداری تعداد آن کاهش پیدا میکند.اما باکتری پروبیوتیکی مثل *باسیلوس کواگولانس* به دلیل توانایی تشکیل اسپور مقاومت بسیار بالایی نسبت به شرایط مواد غذایی دارند می‌توانند جایگزین مناسبی به جای سایر باکتری‌های پروبیوتیکی دیگر باشند (ضیایی و همکاران،۱۳۹۲).

باکتری *باسیلوس کواگولانس* نیز مانند پروبیوتیک های دیگر اثرات سلامت بخش از جمله ایجاد تعادل در فلور طبیعی روده را داراست. علاوه بر خواص ضد میکروبی (Siamansouri *et al*., 2013)، از جمله دیگر مزایای بالقوه و سلامت بخش پروبیوتیک‌ها بخصوص لاکتوباسیل‌ها می‌توان به خواص ضد جهش‌زایی و ضد سرطانی (Liong, 2009)، تقویت و تنظیم سیستم ایمنی (Lebcer *et al*., 2008)، کاهش کلسترول سرم (Madani *et al*., 2013)، بهبود عدم تحمل لاکتوز (Ojetti *et al*., 2010) و افزایش ارزش تغذیه‌ای اشاره کرد. اثرات مفید ناشی از مصرف غذاهای پروبیوتیک تحت تأثیر سویه باکتری پروبیوتیک موجود در فرآورده می‌باشد، این در حالی است که نمی‌توان تمام مزایای ذکر شده را از یک سویه باکتری پروبیوتیک انتظار داشت. بنا به اهمیت لاکتوباسیل‌ها در صنایع غذایی و در نتیجه اهمیت آنها در سلامتی انسان، شناسایی و طبقه‌بندی مولکولی این باکتری‌ها می‌تواند گامی مؤثر در معرفی لاکتوباسیل‌های بومی با خصوصیات عملکردی ویژه و بکارگیری آ نها در محصولات لبنی صنعتی و تولید محصولات فراویژه باشد.

روش های معمولی برای شناسایی پروبیوتیک‌ها روش کشت است که جهت شناسایی افتراقی میکروارگانیسم ها در مواد غذایی با روش کشت حداقل ۴ تا ۶ روز وقت لازم است که روش PCR مسیر جدیدی برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها ایجاد کرده است. نتایج پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که تکنیک PCR کفایت و حساسیت لازم را به منظور پایش میکروارگانیسم‌ها دارد. از این رو استفاده از این روش برای ارزیابی میکروارگانیسم ها در مواد غذایی پیشنهاد می‌شود. اگرچه روش‌های کشت به عنوان روش استاندارد برای ردیابی میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی مطرح است اما این روش‌ها به مدت زمان زیادی نیاز دارد و عوامل انسانی و مواد و تجهیزات سبب خطای قابل توجهی در نتایج حاصله از آن می‌گردد. لذا پیشنهاد می‌شود

Archive of SID

www.SID.ir

از تکنیک PCR در شناسایی پروبیوتیک‌ها استفاده گردد (شاه حسینی، ۱۳۸۹).

Sharef و همکاران روش‌های سنتی فنوتیپیک را با روش مولکولی PCR برای شناسایی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جدا شده از پنیر Aushari (Pesta) موجود در مناطق کرد نشین، مقایسه کردند. نتایج آنها حاکی از حساسیت بسیار بالاتر، دقیق‌تر و ساده‌تر بودن روش PCR نسبت به روش‌های فنوتیپی بود (Sharef *et al.*, 2013). تفویضی و همکاران در سال ۱۳۹۰ طی مطالعه دیگری از روش PCR مبتنی بر آغازگرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس ژن 16S rRNA موفق به جداسازی لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک از فرآورده لبنی سنتی ترخینه شدند. این فرآورده لبنی در مناطق غربی کشور شامل کرمانشاه، لرستان، کردستان و ایلام تولید و مصرف می‌شود و بنابراین توانستند تعدای از لاکتوباسیلوس‌های بومی موجود در فرآورده‌های لبنی این مناطق را جداسازی و شناسایی نمایند. همچنین، قبادی دانا و همکاران در سال ۱۳۹۱ از روش‌های فنوتیپی سنتی و روش مولکولی PCR مبتنی بر آغازگرهای اختصاصی 16S rRNA برای شناسایی لاکتوباسیل‌ها استفاده کردند. آنها همچنین با استفاده از توالی‌یابی قطعات تکثیر شده طی فرآیند PCR و بررسی آنها، درخت فیلوژنی را برای نمونه‌های مورد بررسی رسم نمودند و نشان دادند که دو سویه جدا شده در این مطالعه متعلق به گونه جدید *لاکتوباسیلوس کروستروم* می‌باشند. نتایج حاصل از مطالعات مختلف با استفاده از روش‌های فنوتیپی، ژنوتیپی و یا استفاده از هر دو روش نشان می‌دهند که اگر چه روش‌های فنوتیپی را می‌توان برای جداسازی و شناسایی لاکتوباسلوس‌ها در مواد غذایی به ویژه محصولات لبنی به کار برد اما این روش‌ها بسیار وقت‌گیر، پرهزینه، مشکل، خسته کننده و در بسیاری از مواقع با خطا همراه می‌باشند، چرا که پاسخ‌های فنوتیپی می‌توانند تحت تأثیر شرایط محیطی قرار گیرند. همچنین، عدم تکرارپذیری ناشی از شرایط وابسته به کشت در آزمایشگاه‌های مختلف و تنوع سوش‌ها می‌تواند مشکلات روش‌های فنوتیپی را چندین برابر نماید (Ben amor *et al.*, 2007).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، می‌توان نتیجه گرفت محصولاتی نظیر کیک، بیسکوئیت، ماکارانی، گز، عسل و نان موجود در بازار ایران دارای *باسیلوس کواگولانس* می‌باشند و روش PCR مبتنی بر آغازگرهای comk روشی بسیار ساده، حساس، سریع، دقیق، تکرارپذیر و کم هزینه جهت شناسایی این باکتری‌ها در محصولات جمع‌آوری شده از بازار ایران و محصولات مشابه می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از موسسه دانش بنیان ایرانیان ژن فناور (IGF) و پرسنل آن خصوصا خانم مهسا ملک محمدی کلهرودی، که امکانات علمی و آزمایشگاهی این پروژه را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود. همینطور از خانم دکتر تاج آبادی ،جهت فراهم نمودن قرص لازم تشکر می‌شود.

منابع

تفویضی، ف.، ابراهیمی، م. ت. آ. و خجاره، ل. (۱۳۹۰). شناسایی مولکولی لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک جدا شده از غذاهای سنتی ترخینه و دوغ ترخینه بر اساس توالی 16S rRNA. مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی-مولکولی، جلد ۱۰، شماره ۲، صفحات ۶۸-۶۱.

شاه حسینی، م. (۱۳۸۹). مبانی تشخیص مولکولی. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس.

شاه حسینی، م. (۱۳۸۹). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس.

ضیایی، ا.، اسکندری، م ه.، امانی، ا.، شاد، ا. و مردانی، ا. (۱۳۹۲). تولید ماست پروبیوتیک کم چرب با استفاده از باکتری *باسیلوس کواگولانس* و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میکروبی آن. بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران. دانشگاه شیراز. صفحه ۱.

قبادی دانا، م.، سلیمانیان, ع. ه. و یخچالی، ب. (۱۳۹۱). جداسازی و شناسایی مولکولی لاکتوباسیل‌های موجود در برخی از فرآورده‌های لبنی بومی. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، جلد ۱، شماره ۲، صفحات ۱۱۹-۱۹۹.

گنجوری، م.، مهرابیان، ص. و اخوان سپهی، ع. (۱۳۹۱). غنی‌سازی نان‌های حجیم با باسیلوس‌های بالقوه پروبیوتیک (*باسیلوس کواگولانس*). زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس، شماره (۱)، صفحات ۴۸-۳۷.

Archive of SID

www.SID.ir

همایونی راد، ع.، یارمند، م. س.، احسانی، م. ر. و عزیـزی، ا. (۱۳۸۷). افزایش زنده مانی پروبیوتیک‌ها بوسیله ریزپوشـانی در بستنی فراویـژه. هجـدهمین کنگـره ملـی علـوم و صـنایع غذایی. پارک علم و فـن آوری خراسـان، پژوهشـکده علـوم و صنایع غذایی خراسان رضوی، ایران.

Ben Amor, K., Vaughan, E. E. & de Vos, W. M. (2007). Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. The Journal of Nutrition, 137 (3),741S-747S.

Endres, J. R., Qureshi, I., Farber, T., Hauswrith, J., Hirka, G., Pasics, I. & Schauss, A. G. (2011). One year chronic oral toxicity with combined reproduction toxicity study of a novel probiotic, *Bacillus coagulance*, as a food ingredient. Food and Chemical Toxicity, 49, 1174-1182.

Fooladi, A. A., Khani, S., Hosseini, H. M., Mousavi, S. F., Aghdam, E. M. & Nourani, M. R. (2013). Impact of altered early infant gut microbiota follwing breastfeeding and delivery mode on allergic diseases. Inflamm Allergy Drug Targets,12 (6), 410-418.

Johannsen, E. (2003). Probiotic Bacteria: Their Properties and Mode of Action SA Fam PRACT. 45, 36-38.

Johannsen, S. L., Daligauit, H. E., Davenport, K. W., Jaissle, J., Bruce, D. C., Gibbons, H. S., Coyne, S. R., Lo, C.C., Meincke, L., Munk, A. C., Koroleva, G. I., Rosenzweig, C. N., Palacios, G. F., Redden, C. L., Minogue, T. D. & Chain, P. S. (2015). Genome Announc.

Keller, D., Farmer, S., Mc Cartney, A. & Gibson, G. (2010). *Bacillus coagulans* as a probiotic. Food Science and Technology Bulletin, 7 (7), 103–109.

Liong, M.T. (2008). Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and in-vivo evidence. International Journal of Molecular Sciences, 9(5), 854-863.

Lebeer, S., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S. C. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 72(4), 728-764.

Majeed, M. & Kamarei, R. (2012). *Bacillus coagulans* of probiotik. sabinsa corporation, 20 lake drive, East windsov. Nj 08520, USA.

Ojetti, V., Gigante, G., Gabrielli, M., Ainora, M. E., Mannocci, A. & Lauritano, E. C. (2010). The effect of oral supplementation with Lactobacillus reuteri or tilactase in lactose intolerant patients: randomized trial. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 14(3), 163-170.

Rivera Espinoza, Y. & Gallardo Navarro, Y. (2010). Non –dairy probiotic products. Food Microbiology, 27, 1-11.

Sharef, P. H. & Hassan, K. I. (2013). Comparison of the sensitivity of phenotypic and PCR method for the detection of Lactobacillus acidophilus isolated from Aushari chesse. Journal of Advanced Science and Engineering Research, 3(1), 16-20.

Siamansouri, M., Mozaffari, S. & Alikhani, F. (2013). Bacteriocins and lactic acid bacteria. Bacteriocins and lactic acid bacteria. Journal of Biology and Today's World, 2(5), 227-234.

Archive of SID

www.SID.ir