Archive of SID

مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۱ شماره ۴/ سال ۱۴۰۰/ صفحات ۱۶۹ تا ۱۸۶

DOI: 10.22034/FR.2021.42303.1768

بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی و تکنولوژیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از دوغ محلی بهبهان

محمد نوشاد*[۱]، بهروز علیزاده بهبهانی[۱] و محمد حجتی[۱]

تاریخ دریافت: ۹۹/۷/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۹/۹/۱۸

[۱] به‌ترتیب استادیار، استادیار و استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ایران

*مسئول مکاتبات: Email: noshad@asnrukh.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند علاوه بر اثرات مفیدی که بر سلامتی مصرف‌کنندگان ایجاد می‌کنند، ویژگی‌های متعدد تکنولوژیکی و ضدمیکروبی در ارتباط با استفاده‌های غذایی نیز داشته باشند. **هدف:** هدف از این پژوهش بررسی پتانسیل پروبیوتیکی، تکنولوژیکی و ضدمیکروبی سویه‌های اسید لاکتیک جداشده از دوغ محلی شهرستان بهبهان می‌باشد. **روش کار:** در این مطالعه ابتدا ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک از قبیل زنده‌مانی تحت شرایط اسیدی، زنده‌مانی در محیط شبیه سازی شده معده و روده، هیدروفوبیسیتی، خود و هم‌تجمعی مورد بررسی قرار گرفت. سپس پتانسیل تکنولوژیکی آن‌ها با آزمون‌های قابلیت تولید اسید، فعالیت اتولیتیکی و مقاومت در برابر حرارت تعیین شد. در نهایت فعالیت ضدمیکروبی سویه‌هایی که ویژگی‌های پروبیوتیکی و تکنولوژیکی بهتری داشتند علیه ۵ پاتوژن شاخص غذایی مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج:** سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوبا سیلوس دلبروکی* زمانی‌که در معرض شرایط اسیدی و همین‌طور، شرایط شبیه سازی شده معده و روده قرار گرفتند کمترین کاهش در تعداد را نشان دادند. هیدروفوبیسیتی سویه‌ها ۵۸/۳-۱۷/۵ درصد گزارش شد که بیشترین در صد مربوط به *لاکتوبا سیلوس پلانتاروم* بود. بیشترین میزان خود تجمعی مربوط به *پدیوکوکوس پنتوزا سئوس* بود. بیشترین فعالیت هم‌تجمعی علیه *اشرشیاکلی* مربوط به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با ٤٦/٣ درصد بود. هم‌چنین فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* علیه پاتوژن‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تایفی‌موریوم*، *میکروکوکوس لوتئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفت که بیشترین حساسیت در باکتری‌های *میکروکوکوس لوتئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و بیشترین مقاومت نیز توسط باکتری *اشرشیا کلی* مشاهده شد. **نتیجه‌گیری نهایی:** با توجه به نتایج به دست آمده باکتری‌های *لاکتوبا سیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزا سئوس* خصوصیات مناسبی جهت استفاده به‌عنوان کشت الحاقی برای تولید محصولات تخمیری لبنی از خود نشان دادند.

واژگان کلیدی: باکتری‌های اسید لاکتیک، پروبیوتیک، فعالیت ضدمیکروبی، نوشیدنی لبنی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بشر به‌صورت ناآگاهانه طی هزاران سال از باکتری‌های اسید لاکتیک در تولید غذاهای تخمیری بهره برده است. این امر به خاطر پتانسیل این باکتری‌ها در ایجاد عطر و طعم، مهار پاتوژن‌ها و میکروارگانیسم‌های فاسدکننده می‌باشد. باکتری‌های اسید لاکتیک گرم مثبت، کاتالاز منفی، میکروآئروفیلیک و غیر اسپورزا بوده و ترکیب باز DNA آن ها کمتر از ۵۰ درصد مولی گوانین و سیتوزین (G+C) است. این خانواده از باکتری‌ها جزء فراوان‌ترین گروه باکتری‌های مرتبط با انسان بوده و به طور گسترده در اکوسیستم‌های مختلف وجود دارند. معمولاً در غذاهایی هم‌چون فراورده های لبنی محلی و تخمیری، سبزی‌های تخمیری، گوشت، سیلاژ، خمیر ترش، نوشیدنی‌های تخمیری، فاضلاب‌ها، گیاهان و حتّی در بخش‌های تناسلی، تنفسی و گوارشی انسان و حیوانات یافت می‌شوند (آلوارز-سیرو و همکاران ۲۰۱۶; دسوزا و دیاس ۲۰۱۷; نریمانی و تاری نژاد ۱۳۹۳). بخش گسترده‌ای از سویه‌هایی که به این خانواده تعلق دارند شامل جنس‌های *لوکونوستوک*[۱] *لاکتوکوکوس*[۲] *پدیوکوکوس*[۳] و *لاکتوباسیلوس*[۴] می‌باشند که به مرور جنس‌های دیگری به این خانواده اضافه شده‌اند تا جایی که امروزه باکتری‌های این خانواده حدود ۲۰ جنس را در بر می‌گیرند. استفاده از باکتری‌ها یا متابولیت‌های مفید آن‌ها جهت بهبود ایمنی میکروبی و افزایش ماندگاری مواد غذایی، تحت عنوان نگهدارنده‌های زیستی نام‌گذاری می‌شوند. باکتری‌های اسید لاکتیک معمولا به عنوان ارگانیسم‌هایی که مصرف بالایی در مواد غذایی دارند، شناخته می شوند که با دارا بودن ویژگی های اختصاصی، می‌توانند به عنوان کشت‌های محافظ استفاده شوند (وو و همکاران ۲۰۱۷). در سال ۱۹۰۶ الی متچینکوف[۵] برندهٔ جایزه نوبل و مبتکر پروبیوتیک به معنای رایج امروزی، نخستین بار نظریه خود مبنی بر اثرات سلامتی‌بخش باکتری های اسید لاکتیک را مطرح کرد. بر اساس نظریه او مواد سمی و باکتری‌های عفونت‌زا در دستگاه گوارش انسان عامل تسریع کننده در فرایند کهولت سن هستند که باعث افزایش مرگ سلولی می‌شوند و این عوامل می‌توانند تحت تأثیر باکتری‌های اسید لاکتیک قرار گرفته و کنترل شوند. باکتری‌های پروبیوتیک میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف در مقادیر کافی (10^7 Colony forming unit/ml) می‌توانند باعث حفظ یا بهبود تعادل میکروبی روده شده و اثرات سلامتی‌بخشی برای بدن میزبان داشته باشند. بخش اعظم باکتری‌های پروبیوتیک متعلق به گروه بزرگی از باکتری‌های اصلی فلور روده انسان بوده که در آن‌جا زندگی همسفرگی بی ضرری دارند. میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی به دو گروه باکتری‌ها و قارچ‌ها طبقه‌بندی می‌شوند. از گروه اول می‌توان به لاکتوباسیل و بیفیدوباکتریوم‌ها اشاره نمود. اگر چه برخی از سویه‌های متعلق به *انتروکوکوس*، *لاکتوکوکوس*، *پدیوکوکوس* و *استرپتوکوکوس*[۶] نیز می‌توانند در این تعریف طبقه‌بندی شوند. از مخمرها نیز *ساکارومیسس سرویزیه*[۷] و *ساکارومیسس بولاردی*[۸] می‌توانند به عنوان سویه پروبیوتیک در نظر گرفته شوند. تعریف پروبیوتیک‌ها در گذر زمان دچار تغییر و تکمیل بوده است به‌طوریکه در ابتدا آن‌ها نوعی ماده میکروبی شناخته می‌شدند که باعث تحریک و رشد میکروارگانیسم ها می‌شد. پس از آن باکتری های پروبیوتیک به عنوان موجودات زنده‌ای که می‌توانند در لوله گوارش بدن میزبان، زندگی و ادامه حیات دهند، در نظر گرفته شدند. ولی امروزه باکتری‌های پروبیوتیک نه تنها به عنوان محرک رشد، بلکه تنظیم‌کننده سیستم ایمنی و بهبود دهنده بسیاری از بیماری های عفونی

[۱] *Leuconostoc*
[۲] *Lactococcus*
[۳] *Pediococcus*
[۴] *Lactobacillus*
[۵] Élie Metchnikoff
[۶] *Streptococcus*
[۷] *Saccharomyces cerevisiae*
[۸] *Saccharomyces boulardii*

www.SID.ir

Archive of SID

شـــناخته می‌شـــوند. فواید اســـتفاده از باکتری های پروبیوتیک عبارتند از تاثیر بر آنزیم‌های گوارشـــی و ســـرکوب ترکیبات القا کننده ســـرطان، کاهش کلســـترول خون، کاهش فشار خون، بهبود و تقویت سیستم ایمنی و جلوگیری از عفونت‌ها، کاهش التهابات روده‌ای، بهبود جذب مواد معدنی و ویتامین ها، جلوگیری از رشـــد و تکثیر باکتری های مضـــر، بهبود عمل گوارش و جذب مواد غذایی، کمک به ساخت ویتامین‌های گروه B و K و کـاهش آلرژی‌هـای غـذایی (آبنی و هلوینـگ ۲۰۱۹; حســـینی‌فر و همکاران ۲۰۱۹; دیملوپریرو و همکاران ۲۰۱۸; عبا باف و همکاران ۱۳۹۹). در نظر گرفتن یک میکروارگانیســـم به عنوان ســـویه پروبیوتیک، مســـتلزم انجـام آزمـایش‌هـای *برون‌تنی*[1] و تـأییـد آن‌هـا طی آزمایش‌های *درون‌تنی*[2] می‌باشـد. طبق قوانین ســـازمان بهداشت و خوار و بار جهانی، ارزیابی اولیه ویژگی‌های پروبیوتیکی هر میکروارگانیسم، در شرایط آزمایشگاهی و در چهـار چوب قوانین مـذکور پیش از انجـام آزمایش‌های *درون‌تنی*، اجباری می‌باشـد. در این قوانین، وجود برخی از ویژگی های پروبیوتیکی، ضـــروری و وجود برخی دیگر ترجیح دارد. انتخـاب ســـویـه‌هـای پروبیوتیک بر اســاس ســابقه تاریخی اســتفاده آن‌ها در مواد غذایی و بدون عوارض جانبی می‌باشد. ویژگی‌هایی که برای در نظر گرفتن یک ســـویه به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته می‌شـــوند شـــامل موارد ذیل هســـتند: زنده‌مانی باکتری در طول مراحل تهیه فراورده عملگرا، زنده ماندن در دســـتگاه گوارش، توانایی اتصـــال به ســـلول‌های اپی‌تلیال روده و همچنین توانایی مقابله با عوامل بیماری‌زا. هدف از این پژوهش بررســی پتانسیل پروبیوتیکی (زنده‌مانی در شـــرایط اســـیدی و همینطور شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده، هیدروفیوبیسیتی، خود و هم‌تجمعی[3]) باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از دوغ محلی شـــهرســـتان بهبهان بود. همچنین ویژگی‌های تکنولوژیکی (فعالیت اسیدیفیکاسیون، اتولیتیک، مقاومت به حرارت) آن‌ها تعیین شـــد و در نهایت فعالیت ضـــد میکروبی ســـویه‌ها علیه باکتری‌های پاتوژن شـــاخص غذایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش

جداســازی و شــناســایی ســویه‌های لاکتیکی توســط تکثیر ژن 16S rRNA

سویه‌های لاکتیکی دوغ محلی شهرستان بهبهان توسط تکثیر ژن 16S rRNA به وســـیله واکنش زنجیر های پلیمراز شـــناســـایی شـــدند. ابتدا ۸۵ ایزوله گرم مثبت و کاتالاز منفی جداشـــده از محیط کشـــت با اســـتفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و تخمیر قند گروه‌بندی شـده و از هر گروه یک نماینده جهت انجام آزمون شـــناســـایی مولکولی انتخاب شـــد (حجتی و همکاران ۲۰۲۰). نتایج توالی‌یابی نشان داد این سویه‌ها متعلق به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتو باســـیلوس برویس*، *لاکتو باســـیلوس دلبروکی*، *لاکتو باســـیلوس پنتوســـوس*، *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* و *انتروکوکوس فاسیوم* می‌باشد. در ادامه، ســـویه‌هایی که شـــناســـایی مولکولی آن‌ها انجام شـــده بودند، جهت انجام آزمون‌های بعدی انتخاب شدند.

ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی

زنده‌مانی در شرایط شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش

برای بررســـی مقاومت باکتری‌ها، به شـــرایط اســـیدی، توانایی زنده مانی آن در pH های ۲/۵، ۳/۵ و ۵ مورد بررســـی قرار گرفت. کشـت شـبانه هر باکتری در محیط MRS براث (مرک، آلمان) انجام و سپس سانتریفوژ در ۶۰۰۰rpm بـه مـدت ۱۲ دقیقـه و در دمـای ٤ درجـه ســـانتی‌گراد صـــورت پذیرفت. رســـوب باکتری با PBS استریل و سرد شستشو و سپس در آن حل گردید. در ســـه لوله فالکون مجزا حاوی PBS که pH آن‌ها با HCl

[1] In vitro

[2] In vivo

[3] Auto and Co- aggregation

www.SID.ir

Archive of SID

یک مولار روی ۲/۵، ۳/۵ و ۵ (کنترل مثبت) تنظیم شده بودند، باکتری تا رسیدن به OD آن به ۰/۶تلقیح شد. فالکون‌های حاوی باکتری به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آن، سری‌های رقت تهیه و زنده‌مانی بر روی محیط MRS آگار مورد بررسی قرار گرفت. تعیین زنده‌مانی در شرایط انتقال در دستگاه گوارش مطابق با روش بائو و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. ۳۰ میکرولیتر از هر باکتری به ۲۷۰ میکرولیتر محیط شبیه‌سازی معده (۳/۵ گرم بر لیتر پپسین و ۲ گرم بر لیتر کلرید سدیم) که pH آن روی ۲/۷۵ تنظیم شده بود، اضافه شد و ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس ۳۰ میکرولیتر، به ۲۷۰ میکرولیتر محیط شبیه سازی شده روده (۱ گرم بر لیتر تریپسین، ۵ گرم بر لیتر نمک صفراوی، ۲ گرم بر لیتر پانکراتین، ۱۱ گرم بر لیتر سدیم بیکربنات و ۲ گرم بر لیتر کلرید سدیم) که pH آن روی ۸ تنظیم شده بود اضافه و طی ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. در مرحله بعد باکتری‌ها بر روی محیط کشت MRS آگار در زمان‌های ۱/۵، ۲، ۳ و ٤ ساعت کشت شدند و نتایج بر حسب کاهش لگاریتم CFU/ml نسبت به زمان صفر (زمان صفر: ۸ لگاریتم CFU/ml) گزارش شدند.

هیدروفوبیسیتی سطح سلول[1]

هیدروفوبیستی سطحی به عنوان شاخصی از تمایل باکتری‌ها جهت اتصال به حلال‌های غیر قطبی مطرح می‌شود. در حقیقت، هیدروفوبیسیتی بالا، این پتانسیل را به آن ها می‌دهد که از محیط آبی به محیط آلی یا غیرقطبی نقل مکان کرده و باکتری را قادر می‌سازد به ذرات هیدروکربنی روی سلول یا سطوح مخاطی بچسبد. کشت شبانه‌ای ازباکتری‌ها در ۶۰۰۰rpm به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس توسط PBS استریل و سرد شستشو و مجدداً به‌صورت سوسپانسیون درآمدند و OD آن‌ها در ۶۰۰ نانومتر بر روی ۰/۶ تنظیم گردید (A_1). ٤ میلی‌لیتر از سو سپاندسیون هر باکتری با ۲ میلی‌لیتر n-هگزادکان[2] مخلوط و سپس به مدت دو دقیقه ورتکس شدند. ۱ ساعت در دمای محیط قرار گرفتند تا انتقال باکتری بین دو فاز انجام شود و سپس جذب محلول آبی در ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید (A_2). هیدروفوبیستی با معادله زیر محاسبه شد:

$$\%\text{هیدروفوبیستی} = \left[\frac{A_1 - A_2}{A_1}\right] \times 100$$

خود و هم‌تجمعی

جهت انجام این آزمون ابتدا کشت شبانه‌ای از باکتری‌ها در محیط MRS براث انجام پذیرفت. سپس محیط براث در ۷۰۰۰rpm به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب باکتری با محلول PBS شستشو و بعد در PBS حل گردید تا به OD_{600}=۰/۶ برسد ($Ab_{initial}$). سوسپانسیون به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس جذب نوری قسمت فوقانی سوسپانسیون در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Ab_{final}). درصد خود تجمعی با فرمول ذیل محاسبه شد (روئیزمویانو و همکاران ۲۰۱۹):

$$\%\text{خودتجمعی} = \left[\frac{Abs_{initial} - Abs_{final}}{Abs_{initial}}\right] \times 100$$

برای بررسی هم‌تجمعی، میزان برابری از هر باکتری اسید لاکتیک و همینطور *اشرشیا کلی* با هم مخلوط شده، به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و سپس به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. میزان جذب سوسپانسیون مخلوط و هر کدام از باکتری‌ها به‌صورت مجزا در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و هم تجمعی با فرمول ذیل محاسبه شد (وسیعی و همکارن ۲۰۱۹).

$$\%\text{هم‌تجمعی} = \left[1 - \frac{A_{x+y}}{\frac{A_x + A_y}{2}}\right] \times 100$$

A_x=جذب باکتری اسید لاکتیک

[1] Cell surface hydrophobicity (CSH)

[2] n-hexadecane

www.SID.ir

Archive of SID

جذب باکتری *اشرشیا کلی*=A_y

جذب سوسپانسیون مخلوط=A_{x+y}

ارزیابی پتانسیل تکنولوژیکی

ارزیابی قابلیت تولید اسید

برای سنجش قابلیت تولید اسید جدایه‌های اسید لاکتیک، ابتدا ۱٪ حجمی- حجمی از سویه‌ها در محیط MRS براث فعال شده، سپس به میزان یک درصد در شیر بدون چربی بازسازی شده به‌همراه ۰/۳ درصد عصاره مخمر و ۰/۲ در صد گلوکز کشت شدند و طی نگهداری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، تغییرات pH در زمان‌های ۳، ٦ و ٢٤ ساعت با استفاده از pH متر Lab 827 (متروم، سوییس) مورد بررسی قرار گرفت (کاندیل و ال-سودا ۲۰۱۵).

فعالیت اتولیتیکی

کشت ١٦ ساعته از هر سویه در محیط براث تهیه و سانتریفیوژ در ۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. رسوب سلولی با PBS شستشو شد و سپس در همان بافر تعلیق‌سازی گردید تا جذب نوری آن در ٦٠٠ نانومتر معادل ۱ گردد. محلول حاصل در معرض سیکل انجمادی قرار گرفت (۲۰- درجه سانتی‌گراد، ٢٤ ساعت) سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده و در نهایت میزان فعالیت اتولیتیکی به صورت کاهش درصد جذب در ٦٠٠ نانومتر گزارش گردید (کاندیل و ال-سودا ۲۰۱۵).

$$\%\text{فعالیت اتولیتیکی} = \left[\frac{Abs_0 - Abs_t}{Abs_0}\right] \times 100$$

جذب اولیه =bs_0

جذب اندازه گیری شده بعد از گرمخانه‌گذاری =Abs_t

مقاومت به حرارت

مقاومت حرارتی سویه‌های اسید لاکتیک به دماهای ۵۰، ٦٠، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌ها بعد از قرار گرفتن در حمام آب گرم به مدت ١٦ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و جذب آن‌ها در طول موج ٦٠٠ نانومتر خوانش شد (آدامبرگ و همکاران ۲۰۰۳).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی

ابتدا باکتری‌های اسید لاکتیک در محیط کشت MRS براث به صورت کشت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس سانتریفیوژ در دور ۸۰۰۰g به مدت ۸ دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. بخشی از سوپرناتانت فاقد سلول[1] با pHای که به‌علت فعالیت میکروارگانیسم‌ها و تولید اسیدهای ارگانیک ایجاد شده بود، مورد استفاده قرار گرفت (aCFS) و بخش دیگر سوپرناتانت که pH آن با استفاده از سدیم هیدروکسید روی ۵/۵ تنظیم شده بود، جهت سنجش فعالیت ضد میکروبی استفاده شد (nCFS). جهت اطمینان از عاری بودن هر دو نوع سوپرناتانت از سلول، با فیلتر ۰/۲۲ فیلتر و با دستگاه خشک کن انجمادی BETA LCS plus 2-8 لیوفیلیزه گردید (انجماد در دمای ٤٥ °C- و حرارت‌دهی در دمای ۳۲ °C تحت خلا ۰/۳۸ mbar به مدت ٤٠ h). پودرهای لیوفلیزه شده از هر دو نوع سوپرناتانت در ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل گردید و پتانسیل ضد میکروبی آن‌ها با روش انتشار در اگار مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های پاتوژن (*اشرشیا کلی* ATCC۲۵۹۲۲ ، *سودومو ناس آئروژینوزا* PTCC۱۷۰۷ ، *سالمونلا تایفی‌موریوم* PTCC ۱٦۰۹، *میکروکوکوس لوتئوس* PTCC ۱۱۱۰، *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۵۹۲۳ ATCC) با تعداد تقریبی $۱/۵\times۱۰^۸$ CFU/ml ، در محیط مولر هنیتون آگار[2] (مرک، آلمان) کشت داده شد. در پلیت‌های کشت داده شده، چاهک‌هایی با قطر ٦/٨ mm توسط انتهای پیپت استریل ایجاد و ۱۱۰ µl از سوپرناتانت اسیدی و خنثی شده باکتری وارد چاهک‌ها

[1] Cell-free supernatants (CFSs)

[2] Müller Hinton agar

www.SID.ir

Archive of SID

شد. سپس به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و قطر هاله عدم رشد در اطراف هر چاهک اندازه گیری گردید (جئورجیوا و همکاران ۲۰۱۵).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده ها به روش تجزیه واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گردید. برای مقایسه میانگین ها از روش آزمون چند دامنه ای دانکن و در سطح اطمینان ۹۵ در صد استفاده شد و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱٦ رسم شد.

یافته‌ها

ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی سویه‌ها

میزان زنده‌مانی باکتری‌های اسید لاکتیک در pHهای مختلف و همچنین شرایط شبیه‌سازی شده روده و معده در جدول ۱ نشان داده شده است. مقاوم‌ترین سویه نسبت به pH ۲/۵ و ۳/۵ باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* بودند؛ در حالیکه *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* و *انتروکوکوس فاسیوم* بیشترین لگاریتم کاهش در تعداد را نشان دادند. در pH ۵ نیز تمامی باکتری‌ها بدون کاهش در تعداد قادر به رشد بودند. نسبت به شرایط شبیه‌سازی شده معده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با صفر واحد لگاریتمی کاهش مقاوم‌ترین و *انتروکوکوس فاسیوم* با ۳ واحد لگاریتمی کاهش حساس‌ترین سویه گزارش شدند. بعد از ۳ ساعت قرارگیری در شرایط شبیه‌سازی شده روده، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* با یک واحد لگاریتمی کاهش در تعداد مقاوم‌ترین و *انتروکوکوس فاسیوم* با ۵ واحد کاهش در تعداد حساس‌ترین سویه معرفی شدند.

جدول ۱- مقاومت سویه‌های مختلف اسید لاکتیک باکتری‌ها نسبت به شرایط اسیدی و محیط شبیه سازی شده روده و معده

(نتایج بر حسب لگاریتم CFU/ml کاهش تعداد باکتری‌ها نسبت به تعداد اولیه تلقیح بیان شده است)

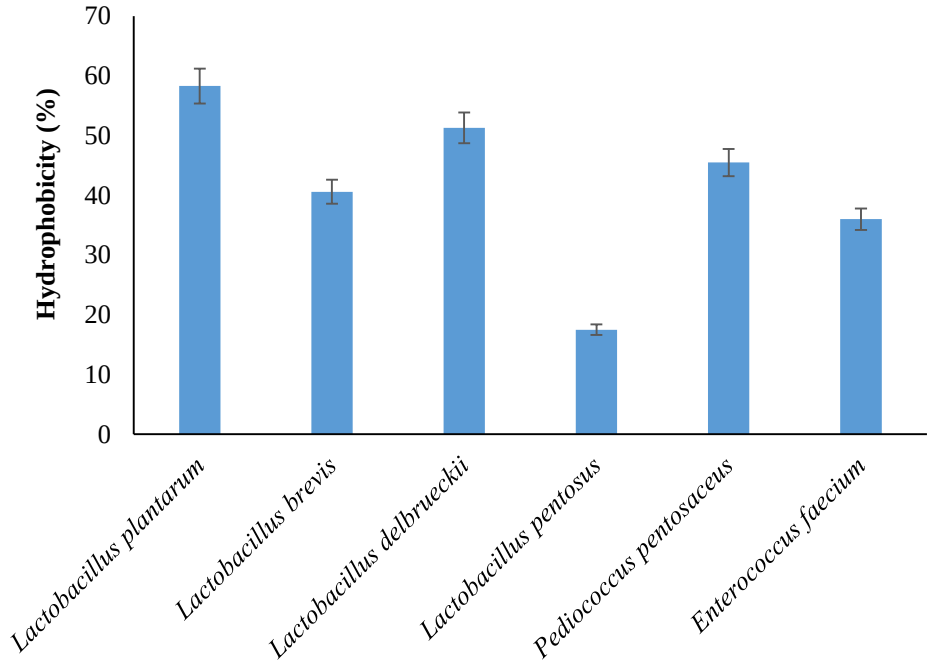
Table 1- The resistant of various strains of *Lactic acid bacteria* to acidic condition and simulated intestinal and gastric juice

(Results are expressed based on CFU/ml logarithm of reduced number of bacteria compared to the initial number of inoculation**)**

Lactic acid bacteria	Resistance to gastrointestinal conditions				resistance to pH		
	Intestinal			Gastric 1.5h			
	4h	3h	2h		pH=5	pH=3.5	pH=2.5
L. plantarum	1	1	0	0	0	0	1
L. brevis	3	1	1	1	0	1	2
L. delbrueckii	1	1	1	1	0	0	1
L. pentosus	4	4	3	2	0	2	3
L. pentosaceus	2	1	1	1	0	0	1
E. faecium	5	4	3	3	0	2	3

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- درصد هیدروفوبیسیتی سویه‌های مختلف اسیدلاکتیک باکتری‌ها

Figure 1- Hydrophobicity percentage of various strains of *Lactic acid bacteria*

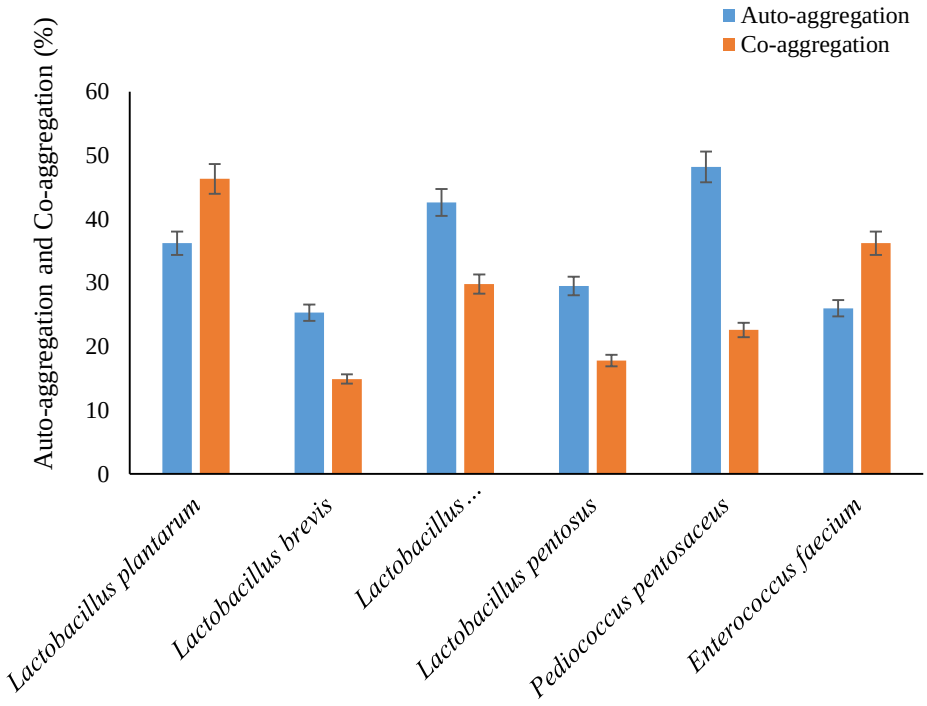
آبگریزی به طور مستقیم به ظرفیت سویه‌ها برای اتصال به منابع غیرقطبی نسبت داده می‌شود. هیدروفوبیسیتی توسط اجزای آبگریز موجود در غشای خارجی باکتری‌ها ایجاد شده و می‌توان از منابعی مانند زایلن[۱] n–هگزادکان، کلروفرم[۲] و اتیل‌استات[۳] برای بررسی این ویژگی استفاده نمود. آبگریزی بر اساس مخلوط کردن سوسپانسیون باکتریایی و محلول غیرقطبی و سپس اندازه‌گیری OD_{600} سطح آبی، قبل و بعد از افزودن محلول محاسبه می‌گردد. همچنین آبگریزی به عنوان اثر متقابل هیدروفوبیکی شناخته می‌شود که نقش مهمی در چسبندگی باکتری‌ها به سلول‌های اپی تلیال دارد. نتایج مربوط به هیدروفوبیسیتی سویه‌ها در شکل ۱ آورده شده است. بالاترین میزان هیدروفوبیسیتی مربوط به سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با ۵۸/۳ درصد و کمترین میزان مربوط به سویه *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* با ۱۷/۵ درصد می‌باشد.

خودتجمعی مشخصه‌ای است که بر روی چسبندگی باکتری پروبیوتیک به سلول‌های روده تاثیر می‌گذارد، در حالی که هم‌تجمعی با باکتری های پاتوژن ویژگی است که بر روی مکانیسم آنتاگونیستی باکتری‌های پروبیوتیک که می‌توانند مانع از اتصال سویه های بیماری‌زا به سلول‌های روده شوند، اثرگذار است. همان‌گونه که در شکل ۲ مشخص است، بیشترین میزان خود تجمعی مربوط به باکتری *پدیوکوکوس پنتوزا سئوس* و سپس *لاکتوبا سیلوس دلبروکی* بوده و بیشترین میزان هم‌تجمعی با باکتری *اشرشیاکلی* نیز توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مشاهده شد.

[۱] Xylene
[۲] Chloroform
[۳] Ethyl acetate

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- نتایج مربوط به آزمون خود و هم‌تجمعی اسیدلاکتیک باکتری‌ها

Figure 2- Results of auto-aggregation and co-aggregation of *Lactic acid bacteria*

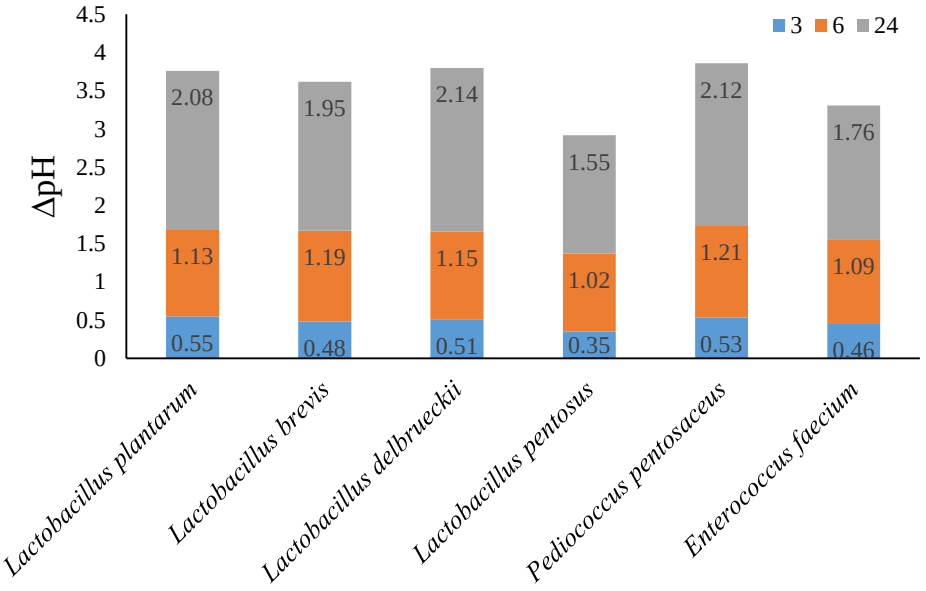
ارزیابی خصوصیات تکنولوژیکی سویه‌ها

پتانسیل کاهش pH توسط سویه‌های مختلف اسید لاکتیک در شکل ۳ نشان داده شده است. یک باکتری با قدرت تخمیر مناسب باید بتواند در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و طی مدت ۳ ساعت pH ای برابر با ۰/۲ ± ۵ ایجاد کند یا تغییرات pH ایجاد شده توسط آن ۰/٤ باشد. در این مطالعه بجز سویه *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* که فاقد توانایی کاهش اسید به میزان ۰/٤ واحد بود، بقیه سویه‌ها این توانایی را دارا بودند. در طی ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری، باکتری‌های *پدیوکوکوس پنتوزا سئوس* و *لاکتوبا سیلوس دلبروکی* بالاترین میزان تغییرات pH را ایجاد نمودند.

فعالیت اتولیتیکی جدایه‌های لاکتیکی دوغ محلی شهرستان بهبهان درطی ٤٨ ساعت به صورت کاهش درصد جذب در طول موج ٦۰۰ نانومتر به صورت نمودار میله‌ای در شکل ٤ نشان داده شده است. پتانسیل باکتری‌های اسید لاکتیک بر حسب شدت اتولیز و بر مبنای درصد کاهش جذب طی فرایند اتولیز مطابق با مطالعه دعوتی و همکاران (۱۳۹٦) و آیاد و همکاران (۲۰۰۱)، به صورت زیر طبقه‌بندی می‌گردد: برای انتروکوکوس‌ها: ۲۲-۰: ضعیف؛ ۳٤-۲٤: نسبتا خوب؛ ٦٦-۳۵: خوب و برای لاکتوباسیل‌ها: ۳۹-۰: ضعیف؛ ٦۹-٤۰: نسبتا خوب؛ ۹٦-۷۰: خوب. بنابراین مطابق با تعریف صورت گرفته باکتری‌های *انتروکوکوس فاسیوم*، *لاکتوباسیلوس پنتوسوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* از نظر پتانسیل اتولیتیکی به ترتیب در محدوده خوب، ضعیف، نسبتا خوب، نسبتا خوب و نسبتا خوب قرار دارند.

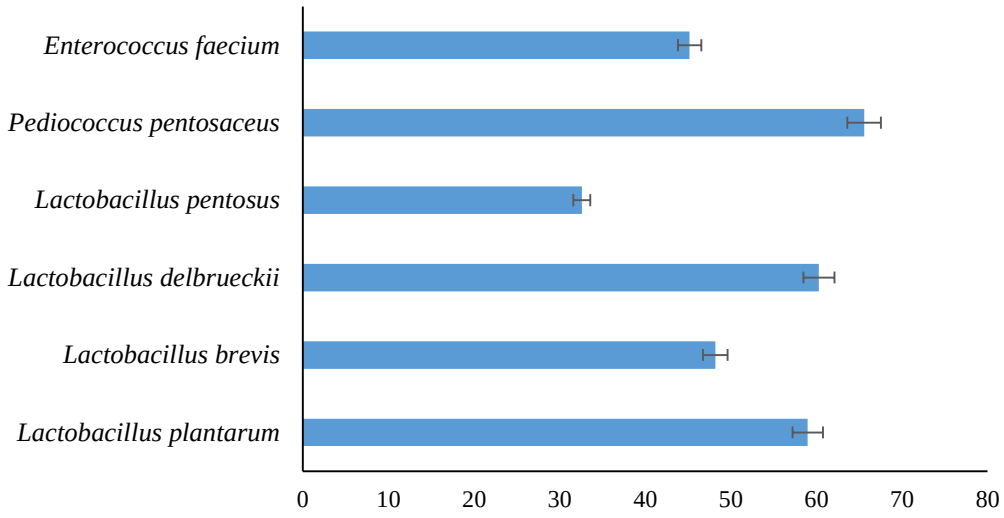
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- تغییرات pH ایجاد شده توسط باکتری‌ها طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری

Figure 3- pH changes caused by bacteria during 24 hours of incubation



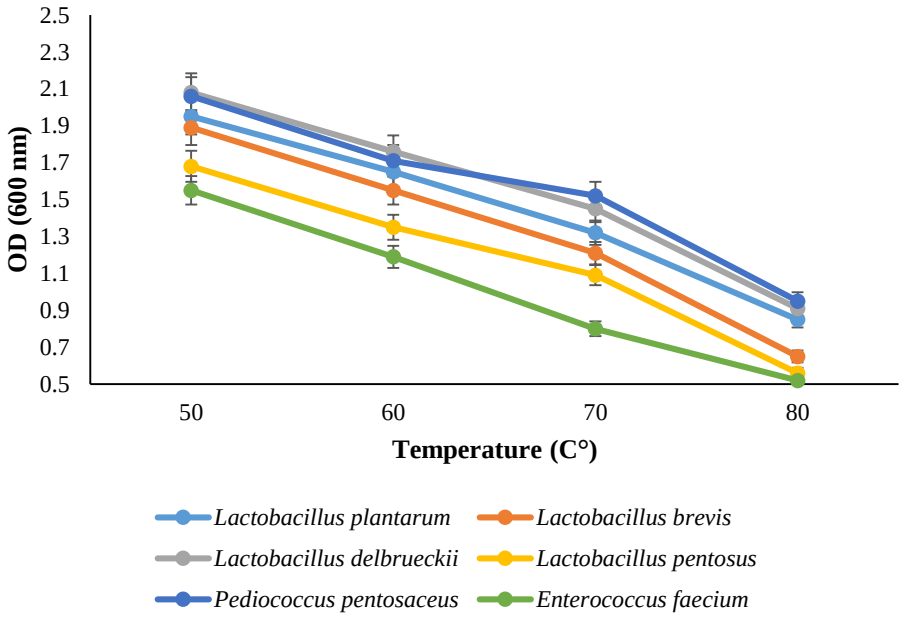
شکل ۴- درصد اتولیز سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک (برحسب کاهش واحد دانسیته نوری در ۶۰۰ نانومتر)

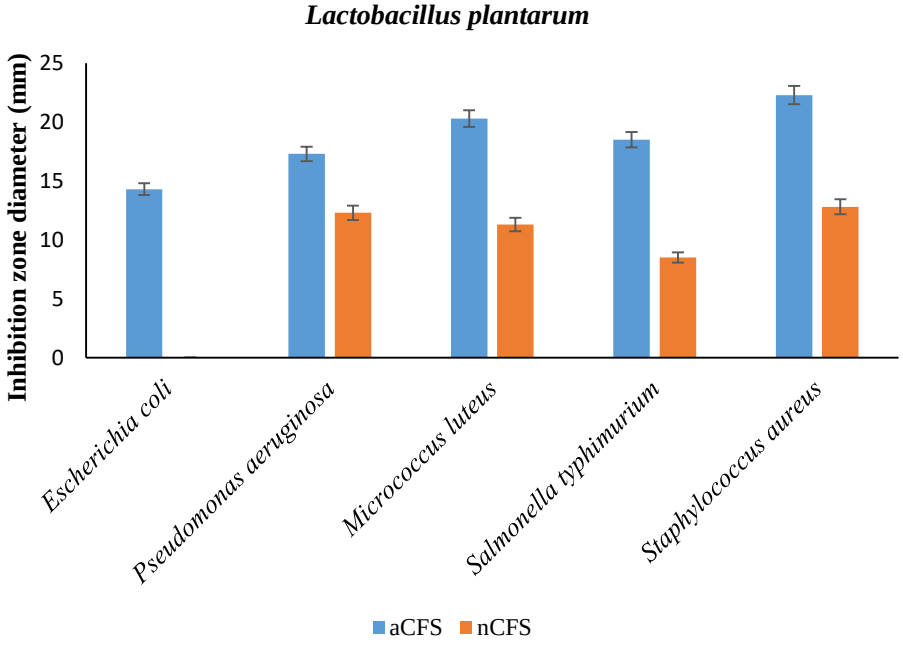
Figure 4- Percentage of autolysis of *Lactic acid bacteria* strains (reduction of light density unit at 600 nm)

www.SID.ir

Archive of SID

مقاومت حرارتی باکتری های اسید لاکتیک از منظر کاربردهای صنعتی آن‌ها بسیار حائز اهمیت است. بنابراین در این مطالعه مقاومت سویه‌های جدا شده از دوغ محلی شهرستان بهبهان نسبت به دماهای ۵۰؛ ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد طی ۲۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. همانگونه که در شکل ۵، مشخص است بیشترین مقاومت و زنده‌مانی مربوط به باکتری‌های *پدیوکوکوس پنتوزا سئوس* و *لاکتوبا سیلوس دلبروکی* و کمترین زنده‌مانی مربوط به *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* و *انتروکوکوس فاسیوم* می‌باشد.



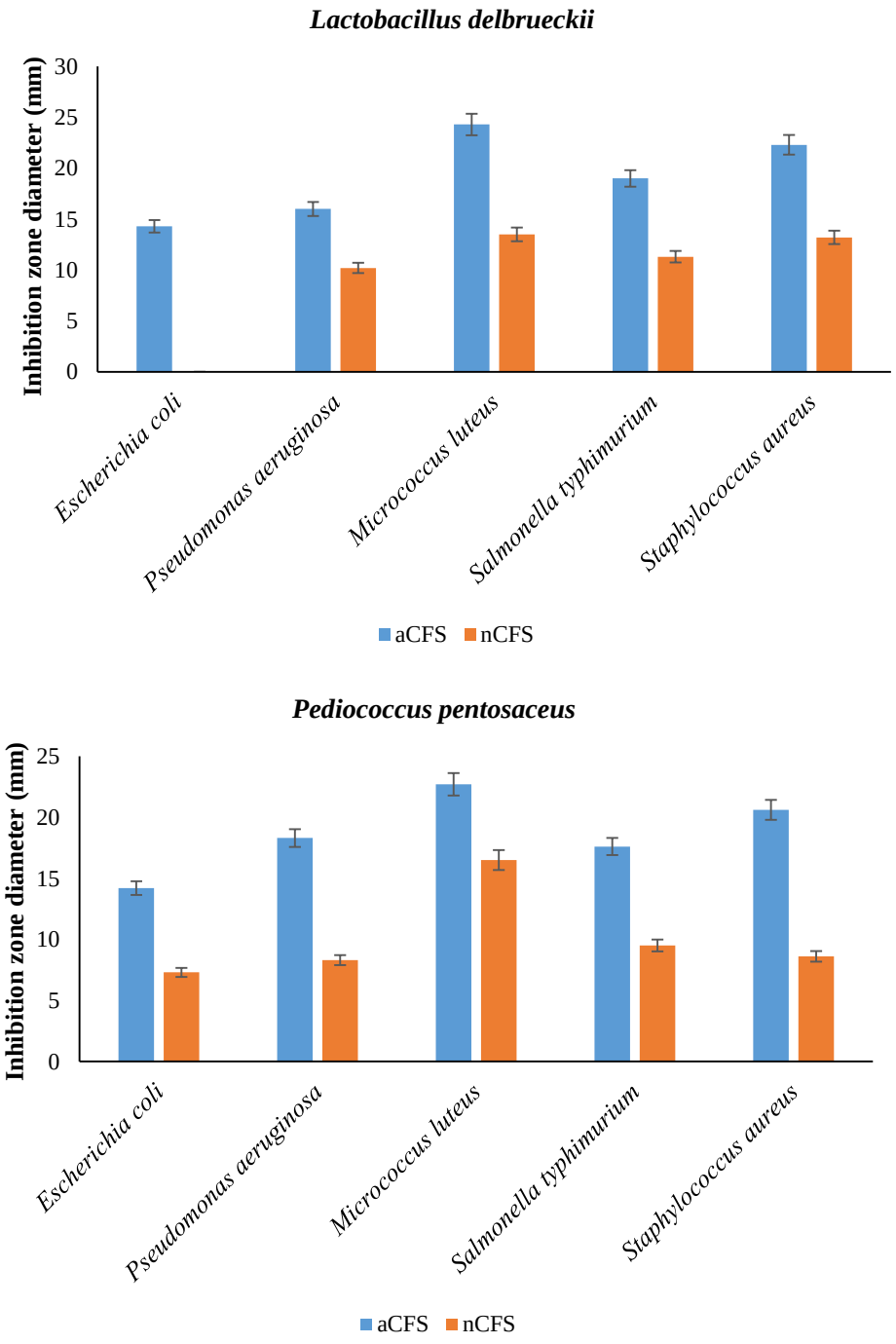


شکل ۵- مقاومت باکتری‌های اسید لاکتیک به دما (برحسب واحد دانسیته نوری جذب شده در ۶۰۰ نانومتر)

Figure 5- Resistance of *Lactic acid bacteria* to temperature (units of optical density absorbed at 600 nm)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶- اثرات ضد میکروبی سوپرناتانت اسیدی و خنثی شده باکتری‌های اسید لاکتیک علیه باکتری‌های بیماری‌زا

Figure 6- Antibacterial activity of acidic and neutralize *Lactic acid bacteria* against pathogenic bacteria

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی

با توجه به این‌که باکتری‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* نتایج پروبیوتیکی و تکنولوژیکی بهتری نسبت به بقیه سویه‌ها از خود نشان دادند، لذا فعالیت ضد میکروبی این سه سویه علیه پاتوژن‌های شاخص، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج فعالیت ضد میکروبی سویه‌ها در شکل ٦ مشخص شده است. در همه تیمارها، سوپرناتانت

www.SID.ir

Archive of SID

اسیدی فاقد سلول تاثیر ضد میکروبی بیشتری نسبت به سوپرناتانت‌های فاقد سلول خنثی شده داشتند. سوپرناتانت خنثی شده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* هیچ اثر ضد میکروبی علیه *اشرشیا کلی* از خود بروز ندادند. کمترین قطر هاله بازدارندگی در برابر سوپرناتانت اسیدی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* مربوط به *اشرشیا کلی* بود. همچنین، حساس‌ترین سویه در برابر سوپرناتانت اسیدی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* بود درحالی‌که *میکروکوکوس لوتئوس* بیشترین قطر هاله بازدارندگی را در برابر سوپرناتانت اسیدی سویه های *لاکتو باسیلوس دلبروکی* و *پدیووکوس پنتوزاسئوس* از خود نشان داد.

بحث

یکی از معیارهای ا صلی انتخاب باکتری‌های پروبیوتیک، زنده‌مانی در pH پایین قسمت فوقانی دستگاه گوارش است تا بتواند به روده بزرگ رسیده و فعالیت مثبت خود را در آن‌جا بروز دهند. ترکیب‌های مختلفی در اسید معده وجود دارد که می‌توانند فعالیت ضد میکروبی داشته باشد که مهم‌ترین آن، pH پایین آن است که توسط اسیدکلریدریک ایجاد می‌شود. معمولا pH زیر ۲/۵، اثر کشندگی بر باکتری‌ها دارد. اگر چه این ویژگی در نابودی میکروب های پاتوژن نقش موثری و مفیدی دارد، می‌تواند اثر کشندگی بر باکتری‌های پروبیوتیک داشته باشد. در شرایط معده pH پایین زمانی اتفاق می‌افتد که معده برای مدت طولانی خالی باشد و هیچ ماده غذایی یا مایعی به آن وارد نشود. در حالی که باکتری‌های پروبیوتیک باید با یک حامل غذایی وارد بدن شوند. در این حالت، هم ماده غذایی pH را افزایش می‌دهد و مانع از اثر تخریبی pH بر باکتری‌ها می‌شود و هم ماتریس ماده غذایی اثر محافظتی بر روی باکتری ها دارد تا توسط اسید معده از بین نروند. باکتری‌ها با مکانیسم‌های مختلفی شرایط pH پایین را تحمل می‌کنند که یکی از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها برای گونه های *لاکتوباسیل* سیستم F0F1-ATPase است (کولن و کلائینهامر ۱۹۹۹; کانها و همکاران ۲۰۱۳). تاکتالی و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند ویژگی مقاومت به شرایط اسیدی وابسته به سویه بوده و برای هر باکتری به‌صورت مجزا باید مورد بررسی قرار گیرد. هم‌چنین گزارش دادند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس برویس* نسبت به *پدیوکوکوس* مقاومت بالاتری نسبت به pH پایین دارد.

هیدروفوبیسیتی یکی از فاکتورهای مهم برای باکتری‌ها جهت چسبندگی به سطوح مختلف جهت تحت تاثیر قرار دادن بافت میزبان محسوب می‌گردد. هیدروفوبیسیتی به فاکتورهای متعددی از قبیل نیروی واندروالس، حرکت براونی[1] بار الکتریکی سطح و نیروی گرانش بستگی دارد. این ویژگی به نوع سویه نیز بستگی دارد؛ لذا در مورد باکتری باید به صورت مجزا این ویژگی بررسی گردد. S-layer که از یک لایه تک مولکولی از پروتئین‌های یکسان یا گلیکوپروتئین‌ها تشکیل شده است نقش مهمی در حرکت براونی باکتری‌های اسید لاکتیک و هیدروفوبیستی آن‌ها دارد (وسیعی و همکاران ۲۰۱۹؛ جیو و همکاران ۲۰۱۰). هیدروفوبیسیتی در صنعت غذا نیز اهمیت دارد. به‌خصوص برای باکتری‌هایی که به صورت گسترده در صنعت لبنیات به عنوان کشت همراه یا کشت آغازگر استفاده می‌شوند، میل ترکیبی آن‌ها برای اتصال به چربی شیر و ترکیبات معطر می‌تواند ثبات امولسیون‌ها را تغییر دهد (لی و همکاران ۲۰۰۸). عواملی که سلامتی انسان را با جلوگیری از چسبندگی موجودات بیماری‌زا تقویت می‌کنند شامل حضور فیزیکی باکتری‌های پروبیوتیک و نقش این باکتری‌ها در تنظیم سیستم ایمنی بدن هستند. در حقیقت ویژگی آنتاگونیستی باکتری‌های پروبیوتیک با مکانیسم‌های

[1] Brownian movement

www.SID.ir

Archive of SID

مختلفی می‌تواند رخ دهد از قبیل: کاهش pH روده، رقابت با باکتری‌های پاتوژن در چسبیدن به گیرنده‌های سلول های اپی تلیال و رقابت بر سر مواد غذایی. خودتجمعی میان میکروارگانیسم‌ها به صورت دو تایی و کاملاً اختصاصی است و چسبیدن از طریق اتصال یک سلول با گیرنده پلی‌ساکاریدی سلول دیگر تکمیل می‌گردد (آسلیم و همکاران ۲۰۰۷؛ امین نژاد و کسری-کرمانشاهی ۱۳۹۳). در پژوهشی که توسط امین‌نژاد و کسری-کرمانشاهی (۱۳۹۳)، صورت پذیرفت نشان داده شد که بخش شناور باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* باعث کاهش میزان رشد، تشکیل بیوفیلم و در نتیجه چسبندگی *سودوموناس آئروژینوزا* به سلول‌های روده می گردد.

قابلیت تولید اسید یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های باکتری های اسید لاکتیک است که هم از نظر بعد تکنولوژیکی عطر و طعم خاصی به محصول فراوری شده می‌دهد و هم از بعد ایمنی باعث جلوگیری از رشد باکتر های پاتوژن می‌گردد. دعوتی و زیبایی (۱۳۹۶) گزارش کردند تمامی سویه‌های اسید لاکتیک جدا شده از شیر شتر تک کوهانه ایرانی قابلیت کاهش ۰/٤ واحد pH در ۳ ساعت نخست تخمیر را دارا بودند. همچنین بیان داشتند سویه های *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* و *انتروکوکوس لاکتیس* بیشترین قدرت تولید اسید بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسید لاکتیک را دارا بودند. میردا مادی و همکاران (۱۳۸٦) تولید اسید لاکتیک توسط سویه های مختلف *لاکتوباسیل* را مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج در محیط کشت حاوی گلوکز، *لاکتوباسیلوس کازئی* با تولید ۹۵ گرم بر لیتر لاکتات کلسیم و بازده ۹۵ درصد و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* با تولید ۸۱/٤ گرم بر لیتر لاکتات کلسیم و بازده ٦۳ درصد به عنوان بهترین باکتری های هموفرمانتاتیو تولید کننده نوع ایزومر نوری (+) L اسید لاکتیک انتخاب شدند.

فعالیت اتولیتیک یک مشخصه مطلوب در باکتری‌های اسیدلاکتیک است که باعث انتشار آنزیم‌های درون سلولی مانند لیپاز و پروتئاز شده که در تشکیل عطر و طعم محصولات لبنی نقش موثری ایفا می‌کنند. در این مطالعه *لاکتوباسیل*ها بر اساس طبقه‌بندی ارائه شده توسط آیاد و همکاران (۲۰۰۱) و دعوتی و همکاران (۱۳۹٦) از فعالیت اتولیتیکی نسبتا خوبی برخوردار بودند. نتایج مشابهی در این زمینه توسط سایر محققین مشاهده شده است. ال-سودا و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی فعالیت اتولیتیکی سویه‌های لاکتیکی مورد مطالعه خود را به سه گروه تقسیم بندی کردند؛ باکتری‌های مانند *لاکتوباسیلوس رامنسوس* FAUU110 و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* زیرگونه کازئی FAAU27 جزء دسته خوب با فعالیت اتولیتیکی ۹٤-۷۳ درصد گزارش شدند، باکتری-هایی مانند *لاکتوباسیلوس رامنسوس* FAAU23 با فعالیت اتولیتیکی ٦۹-٤۰ درصد جزء گروه متوسط طبقه بندی شدند و باکتری‌هایی مانند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* FAAU20 و *لاکتوباسیلوس رامنسوس* FAAU141 با فعالیت اتولیتیکی ۳۹-٤ درصد جزء گروه ضعیف طبقه-بندی گردیدند.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد سوپرناتانت اسیدی فاقد سلول تاثیر ضد میکروبی بیشتری بر روی پاتوژن های مورد مطالعه از خود نشان دادند. بجز *اشرشیا کلی*، بقیه باکتری‌ها دارای درجات مختلفی از حساسیت نسبت به فعالیت ضد میکروبی متابولیت‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک را دارا بودند. باکتری‌های گرم منفی روده‌ای از قبیل *اشرشیا کلی* و *سالمونلا تایفی موریوم* از مهم‌ترین عوامل ایجاد مسمومیت‌های غذایی و اسهال می‌باشند. با توجه به مقاومت‌های دارویی که در گذر زمان در این باکتری‌ها اتفاق افتاده است و اثرات درمانی و خصوصا آنتی‌بیوتیک‌تراپی را کاهش داده است، جایگزین نمودن روش‌های جدید درمانی امری ضروری بنظر می‌رسد. امروز از باکتری های اسید لاکتیک جهت کاربردهای

www.SID.ir

Archive of SID

ضدمیکروبی آن‌ها استفاده گسترده‌ای می‌شود. باکتری‌های اسید لاکتیک علاوه بر اینکه پتانسیل نابودی باکتری‌های پاتوژن را دارا هستند، می‌توانند متابولیت‌ها و توکسین‌های تولیدی توسط آن‌ها را نیز خنثی کنند. فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک مربوط به عوامل گوناگون و متعددی می‌باشد از جمله تولید اسیدهای آلی (عمدتا اسید لاکتیک و اسید استیک)، پراکسید هیدروژن، استالدئید، دی‌استیل، آمونیاک و همچنین ترکیباتی با خاصیت پروتئینی به نام باکتریوسین (تکو و همکاران ۲۰۱۹). استروس و همکاران (۲۰۰۱) فعالیت ضد میکروبی برخی از سویه‌های لاکتوبا سیلوس را علیه پاتوژن‌های بی‌هوازی دستگاه گوارش مورد مطالعه قرار داده و اثرات ضد میکروبی آن‌ها را تایید کردند.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق سویه های جدا شده از دوغ محلی شهرستان بهبهان ابتدا از نظر ویژگی‌های پروبیوتیکی از قبیل زنده‌مانی در دستگاه گوارش، هیدروفوبیسیتی، خود و هم‌تجمعی مورد بررسی قرار گرفتند؛ سپس ویژگی‌های تکنولوژیکی آن‌ها از قبیل قابلیت تولید ا سید، فعالیت اتولیتیکی و مقاومت در برابر حرارت مورد برر سی گرفت و در نهایت سویه‌هایی که شرایط بهتری در برابر آزمون‌های انجام شده داشتند، فعالیت ضد میکروبی آن‌ها علیه ۵ پاتوژن شاخص مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده، سویه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* بهترین عملکرد را از خود نشان داد ند و می‌توان از آن ها ج هت استفاده از سویه‌های مکمل در تولید محصولات غذایی استفاده نمود. پیشنهاد می‌شود آزمون های تکمیلی از قبیل توانایی چ سبندگی به سلول‌های اپی تلیال روده، فعالیت ضد چسبندگی علیه پاتوژن‌های شاخص، فعالیت لیپولیتیک و پروتئولیتیکی این سه سو یه نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت مالی طرح تحقیقاتی شماره ۹۹۱/۰۷ که این مقاله مستخرج از آن می‌باشد تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

امین‌نژاد س و کسری-کرمانشاهی ر. ۱۳۹۳. فعالیت ضد بیوفیلمی بخش شناور فاقد سلول *لاکتوبا سیلوس کازئی* در *سودوموناس آئروژینوزا*، دوماهنامه فیض، ۱۸ (۱)، ۳۰-۳۷.

دعوتی ن و زیبائی س. ۱۳۹۶. جدا سازی و شنا سایی باکتریهای ا سید لاکتیک دوغ شیر شتر تک کوهانه ایرانی و برر سی خواص تکنولوژیکی آن‌ها، مجله علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۴ (۶۵)، ۳۱۱-۳۲۲.

عباباف خ، جوینده ح و ناصحی ب.۱۳۹۹. تأثیر تیمار آنزیمی ترانس گلوتامیناز بر ویژگی های فیزیکی شیمیایی و میکروبی ماست سویای سین بیوتیک، پژوهش های صنایع غذایی، ۳۰ (۳)، ۱۸۹-۲۰۱.

میردامادی س، رجبی ا، عزیزمحسنی ف و مومن ب. ۱۳۸۶. تولید اسید لاکتیک توسط سویه های مختلف لاکتوباسیل، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۲ (۳)، ۵۷-۶۴.

نریمانی ط وتاری نژاد ع. ۱۳۹۳. جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری های پروبیوتیک از شیر و ماست سنتی گاومیش شهرستان خوی، ۲۴ (۳)، ۳۴۹- ۳۳۵.

Abney KN and Hewlings SJ, 2019. Probiotic supplementation and reducing infiammation in hemodialysis patients: A systematic review. Journal of Renal Nutrition and Metabolism 5(1): 3-6.

www.SID.ir

Archive of SID

Adamberg K, Kask S, Laht TM and Paalme T, 2003. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. International Journal of Food Microbiology 85(1-2): 171-183.

Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D and Kuipers OP, 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. Applied Microbiology and Biotechnology 100(7): 2939-2951.

Aslim B, Onal D and Beyatli Y, 2007. Factors influencing autoaggregation and aggregation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus isolated from handmade yogurt. Journal of Food Protection 70(1): 223-227.

Ayad EH, Verheul A, Wouters JT and Smit G, 2001. Population dynamics of lactococci from industrial, artisanal and non-dairy origins in defined strain starters for Gouda-type cheese. International Dairy Journal 11(1-2): 51-61.

Bao Y, Zhang Y, Zhang Y, Liu Y, Wang S, Dong X, Wang Y and Zhang H, 2010. Screening of potential probiotic properties of Lactobacillus fermentum isolated from traditional dairy products. Food Control 21(5): 695-701.

Cunha AF, Acurcio LB, Assis BS, Oliveira DL, Leite MO, Cerqueira MM and Souza MR., 2013. In vitro probiotic potential of Lactobacillus spp. isolated from fermented milks. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 65(6):1876-1882.

de Souza JV and Dias FS, 2017. Protective, technological, and functional properties of select autochthonous lactic acid bacteria from goat dairy products. Current Opinion in Food Science 1: 13:1-9.

de Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Júnior AI, Thomaz-Soccol V and Soccol CR, 2018. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. Biotechnology Advances 36(8): 2060-2076.

El Soda M, Ahmed N, Omran N, Osman G and Morsi A, 2003. Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheesemaking. Emirates Journal of Food and Agriculture 51-71.

Georgieva R, Yocheva L, Tserovska L, Zhelezova G, Stefanova N, Atanasova A, Danguleva A, Ivanova G, Karapetkov N, Rumyan N and Karaivanova E, 2015. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of Lactobacillus and Bifidobacterium spp. intended for use as starter and probiotic cultures. Biotechnology & Biotechnological Equipment 29(1): 84-91.

Guo XH, Kim JM, Nam HM, Park SY and Kim JM, 2010. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. Anaerobe 16(4):321-326.

Hojjati, M., Alizadeh Behbahani, B., and Falah, F, 2020. Aggregation, adherence, anti-adhesion and antagonistic activity properties relating to surface charge of probiotic *Lactobacillus brevis* gp104 against *Staphylococcus aureus*. Microbial Pathogenesis 147: 104420.

Hoseinifar SH, Ringø E, Shenavar Masouleh A and Esteban MÁ, 2016. Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review. Reviews in Aquaculture 8(1): 89-102.

Kandil S and El Soda M, 2015. Influence of freezing and freeze drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains. Advances in Microbiology 5: 371-382.

Kullen MJ and Klaenhammer TR, 1999. Identification of the pH-inducible, proton-translocating F1F0-ATPase (atpBEFHAGDC) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. Molecular Microbiology 33(6):1152-1161.

Ly MH, Aguedo M, Goudot S, Le ML, Cayot P, Teixeira JA, Le TM, Belin JM and Waché Y, 2008. Interactions between bacterial surfaces and milk proteins, impact on food emulsions stability. Food Hydrocolloids 22(5):742-751.

Ruiz-Moyano S, dos Santos MT, Galván AI, Merchán AV, González E, de Guía Córdoba M and Benito MJ, 2019. Screening of autochthonous lactic acid bacteria strains from artisanal soft cheese: probiotic characteristics and prebiotic metabolism. LWT 14:108388.

Strus M, Pakosz K, Gościniak H, Przondo-Mordarska A, Rozynek E, Pituch H, Meisel-Mikołajczyk F and Heczko PB, 2001. Antagonistic activity of Lactobacillus bacteria strains against anaerobic gastrointestinal tract pathogens (Helicobacter pylori, Campylobacter coli, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*). Medycyna doswiadczalna i Mikrobiologia 53(2):133-142.

www.SID.ir

Archive of SID

Techo S, Visessanguan W, Vilaichone RK and Tanasupawat S, 2019. Characterization and antibacterial activity against helicobacter pylori of Lactic Acid Bacteria isolated from thai fermented rice noodle. Probiotics and Antimicrobial Proteins 11(1): 92-102.

Tokatlı M, Gülgör G, Bağder Elmacı S, Arslankoz İşleyen N and Özçelik F, 2015. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. BioMed Research International. 2015;2015.

Vasiee A, Mortazavi SA, Sankian M, Yazdi FT, Mahmoudi M and Shahidi F, 2019. Antagonistic activity of recombinant Lactococcus lactis NZ1330 on the adhesion properties of Escherichia coli causing urinary tract infection. Microbial Pathogenesis 133:103547.

Wu C, Huang J and Zhou R, 2017. Genomics of lactic acid bacteria: current status and potential applications. Critical Reviews in Microbiology 43(4): 393-404.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Food Researches/vol.31 No.4 2021/pp 169-186
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir
DOI: 10.22034/FR.2021.42303.1768

Investigation of probiotic and technological characteristics of lactic acid bacteria isolated from native Doogh in Behbahan

M Noshad[1*], B Alizadeh Behbahani[1] and M Hojjati[1]

Received: October 19, 2020 Accepted: December 8, 2020
[1]Assistant Professor, Assistant Professor and Professor respectivly, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
[*]Corresponding author: Email: noshad@asnruk.ac.ir

Introduction: During thousands of years, human has unconsciously benefited from *lactic acid bacteria* (*LAB*) in the production of fermented food. This is due to the potential of these bacteria to release odor and flavor, and inhibit the growth of pathogens and food-spoilage microorganisms (Alvarez-Sieiro et al., 2016). LAB is Gram-positive, catalase-negative, microaerophilic and non-spore forming. In addition to their health-promoting effects, they have numerous technological and microbiological properties in food products. LAB is usually known as the microorganisms highly consumed in food products, which can be utilized as protective culture media, owing to their specific characteristics (Abney and Hewlings, 2019). Probiotics are living microorganisms that when consumed in adequate amount (10^7 CFU/mL) can maintain or improve the intestinal microbial balance and have health-promoting effects on the host. Considering a microorganism as a probiotic strain requires in vitro tests and their confirmation during in vivo experiments. Features that are considered a probiotic for a strain include: bacterial survival during the process of preparing a functional product, gastrointestinal survival, ability to attach to intestinal epithelial cells, as well as the ability to deal with pathogens (De Melo Pereira et al., 2018). The present study aims to examine the probiotic potential (viability in acidic and simulated gastrointestinal conditions, hydrophobicity, auto- and co-aggregation) of the LAB isolated from Behbahan local Doogh. Next, their technological properties (acidification and autolytic activities, and heat resistance) were determined. Finally, the antimicrobial activity of the strains was measured against some food pathogens.
Material and methods: In this study, the LAB strains of Behbahan local Doogh were identified through 16S rRNA gene replication by a polymerase chain reaction. First, 85 Gram-positive and catalase-negative isolates were categorized using biochemical and sugar fermentation tests. One representative was selected from each group for the molecular identification test. In order to investigate the resistance of the bacteria to acidic conditions, their viability was examined at pH values of 2.5, 3.5 and 5. For determining the LAB viability in the gastrointestinal system, 30 µl of each bacterium was added to 270 µl of simulated gastric juice (2.5 g pepsin/l and 2 g NaCl/l) whose pH had been set at 2.75 and incubated at 37°C for 1.5 h. Then, 30 µl was mixed with 270 µl of simulated intestinal juice (1 g trypsin/l, 5 g bile salt/l, 2 g pancreatin/l, 11 g sodium bicarbonate/l and 2 g sodium chloride/l) whose pH had been adjusted to 8 and incubated at 37°C for 4 h. Afterwards, the bacteria were cultured on MRS agar at 1.5, 2, 3 and 4 h. The results were expressed as the reduction of log CFU/ml relative to time zero (time zero: 8 log CFU/ml). The other probiotic properties of the LAB, including hydrophobicity, auto- and co-aggregation were also investigated. Their technological potential was determined though acidification ability, autolytic activity and resistance to heat. Eventually, the antimicrobial activity of the strains with better probiotic and technological properties was examined against 5 food pathogens (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus*). One-way

www.SID.ir

Archive of SID

analysis of variance was conducted using statistical package for the social sciences (SPSS) version 22. Duncan`s multiple range test was employed for mean comparison at 95% confidence level.

Results and discussion: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* and *Pediococcus pentosaceus* were the most resistant strains to the pH values of 2.5 and 3.5, while *Lactobacillus pentosus* and *Enterococcus faecium* showed the most pronounced reduction of log CFU/ml. At the pH value of 5, all the bacteria were able to grow without being reduced. Relative to the simulated gastric juice, *L. plantarum* was the most resistant one with a reduction of zero log CFU/ml and *E. faecium* was the most sensitive one with a reduction of 3 log CFU/ml. After 3 h of digestion by the simulated intestinal juice, *L. plantatum* and *L. delbrueckii* were the most resistant strains with a reduction of 1 log CFU/ml and *E. faecium* was the most susceptible one with a reduction of 5 log CFU/ml. The hydrophobicity of the strains was reported to be 17.5-58.3%, the highest of which belonged to *L. plantarum*. The co-aggregation of the LAB varied from 25.3 to 48.2%, the highest of which was associated with *P. pentosaceus*. In addition, all the strains showed co-aggregation activity against *E. coli*, and *L. plantarum* had the highest value of co-aggregation (46.3%). In terms of the technological properties, the results revealed that all the strains were capable of acid reduction up to 0.4 except *L. pentosus*. During 24 h of incubation, *P. pentosaceus* and *L. delbrueckii* caused the largest pH variations. The results of the autolytic activity of the LAB isolates indicated that all the *L. pentosus*, *L. plantatum* and *L. delbrueckii* could be grouped as relatively good. The highest viability and heat resistance belonged to *P. pentosaceus* and *L. delbrueckii* and the lowest viability was related to *L. pentosus* and E. faecium. In general, *L. delbruckeii* and *P. pentosaceus* showed the best results in all the technological tests. Moreover, the antimicrobial activity of *L. plantarum*, *L. delbrueckii* and *P. pentosaceus* was investigated against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *M. luteus* and *S. aureus*. In all the samples, the acidic cell-free supernatant had a greater antimicrobial effect than the neutralized cell-free supernatant. The neutralized supernatant of *L. plantarum* and *L. delbrueckii* had no antimicrobial effect on *E. coli*. The shortest inhibition zone diameter of the acidic supernatants of *L. plantarum*, *P. pentosaceus* and *L. delbrueckii* was associated with *E. coli*. Furthermore, *S. aureus* was the most sensitive strain against the acidic supernatant of *L. plantatum* and *S. aureus*, whereas *M. luteus* had the longest inhibition zone diameter against the acidic supernatants of *L. delbrueckii* and *P. pentosaceus*.

Conclusion: Considering the obtained results, *L. delbrueckii*, *L. plantarum* and *P. pentosaceus* had superlative performances and can be used as complementary strains in the production of food products. It is suggested that supplementary tests, including the adhesion ability to intestinal epithelial cells, anti-adhesion ability against specific pathogens, and the lipolytic and proteolytic activity of these three strains be evaluated.

Keywords: Lactic acid bacteria, Probiotic, Antimicrobial activity, Dairy beverage

www.SID.ir