مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره نهم، شماره پنجم، مرداد ۹۴
صفحه ۱۱ الی ۲۲

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده از کیمچی تولیدشده در ایران

فریده طباطبایی یزدی[1*]، علیرضا وسیعی[2]، بهروز علیزاده بهبهانی[2]، سیدعلی مرتضوی[3]

[1]دانشیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[2]دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[3]استاد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
فریده طباطبایی یزدی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
tabatabai@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۵

تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: پروبیوتیک‌ها به مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌هایی اطلاق می‌شود که وقتی به میزان مناسب در دستگاه گوارش وجود دارند می‌توانند تأثیرات مفیدی بر میزبان برجای بگذارند. با توجه به کاهش مصرف محصولات غذایی سنتی تخمیری که به موجب آن، امکان از دست دادن بسیاری از سویه‌های پروبیوتیک وجود دارد، جداسازی و شناسایی این باکتری‌ها از محصولات غذایی سنتی و سلامتی‌زا ضروری به‌نظر می‌رسد. کیمچی نوعی غذای تخمیری است که به‌نظر می‌آید دارای سویه‌های پروبیوتیکی باشد. در این پژوهش پتانسیل پروبیوتیکی سویه‌های جداشده از کیمچی بررسی شد.

روش بررسی: جهت تعیین ویژگی‌های پروبیوتیکی جدایه‌های مذکور، آزمایشهای تأییدی شامل بررسی مقاومت به اسید (pHهای مساوی ۲، ۳ و ۷)، بررسی مقاومت به نمک‌های صفراوی (درصد ۰، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۵، ۱ و ۲٪)، فعالیت ضدباکتریایی و در نهایت، بررسی مقاومت سویه‌های مورد آزمون نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌های رایج انجام شد.

یافته‌ها: در این مطالعه از بین ۵۵ سویه مورد آزمایش، پدیوکوکوس‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها، ویژگی‌های پروبیوتیکی خوبی نشان دادند، به‌گونه‌ای‌که بیشترین پتانسیل پروبیوتیکی متعلق به سویه‌های *Lactobacillus plantarum* PD412 و *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 بود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، جنبه‌های ایمنی مصرف این باکتری‌ها، از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک نشان داد این دو باکتری واجد مقاومت طبیعی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. لذا با توجه به پتانسیل پروبیوتیکی بالای باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی‌شده از کیمچی،توصیه می‌گردد از این ماده غذایی به‌عنوان یک مکمل پروبیوتیکی استفاده شود.

کلید واژه‌ها: کیمچی؛ پروبیوتیک‌ها؛ لاکتوباسیلوس؛ پدیوکوکوس؛ ایران.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Tabatabaei Yazdi F, Vasiee A, Alizadeh Behbahani B, Mortazavi SA. Evaluationof probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Kimchi produced in Iran. Qom Univ Med Sci J 2015;9(5):11-22. [Full Text in Persian]

www.SID.ir

مقدمه

اولین مطالعات بالینی بر روی پروبیوتیک‌ها در اوایل دهه ۱۹۳۰ در مورد اثربخشی در یبوست انجام شد. واژه پروبیوتیک؛ به معنی زندگی، از زبان یونانی مشتق شده است (۱). به‌نظر می‌رسد تعریف زیر به‌عنوان یک تعریف جامع در مورد پروبیوتیک‌ها مطرح باشد: فرآورده یا محصولی حاوی میکروارگانیسم‌های زنده و مشخص در تعداد کافی، که فلور میکروبی را از طریق جای‌گیری (Implantation) یا کولونیزاسیون در بخشی از بدن میزبان تغییر داده و بدین ترتیب باعث اعمال اثرات مفید بر سلامتی میزبان می‌شود (۲). بررسی بقای باکتری‌ها در سیستم گوارشی یکی از مهم‌ترین فاکتورها در انتخاب سویه پروبیوتیک است. از این‌رو، بررسی بقای باکتری در سیستم گوارشی برای انتخاب باکتری پروبیوتیک الزامی است. مقاومت در برابر اسید و صفرا، دو ویژگی اساسی برای پیش‌بینی توانایی باکتری برای عبور از دستگاه گوارش است (۳). بنابراین، ارزیابی مقاومت به اسید و صفرا برای تعیین توانایی تحمل اسید معده و نمک‌های صفراوی روده صورت می‌گیرد. باکتری‌های اسید لاکتیک؛ باکتری‌هایی گرم مثبت، میکروآئروفیلیک (Microaerophilic) و غیرهاگزا بوده که ترکیب باز DNA آنها کمتر از ۵۰٪ مولی گوانین و سیتوزین (G+C) می‌باشد و عموماً فاقد کاتالاز هستند. هرچند مواردی از کاتالاز کاذب (Pseudo-catalase) در کشت‌هایی که غلظت قند در آنها کم بوده، مشاهده شده است (۴). بجز تعداد اندکی از جنس‌های این خانواده که پاتوژن هستند بقیه جنس‌ها، غیرپاتوژن بوده و عموماً به‌عنوان ایمن در نظر گرفته می‌شوند (Generally Recognized as Safe) (۵). برخی از سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک، خاصیت پروبیوتیکی (Probiotic) دارند. کیمچی (Kimchi) یک خوراک تخمیرشده سنتی است که از سبزیجات، ادویه‌جات گوناگون و البته بیشتر اوقات با نوعی کلم چینی درست می‌شود. تخمیر کیمچی پس از فرآیند کنترلی نمک‌سودکردن انجام می‌گیرد.

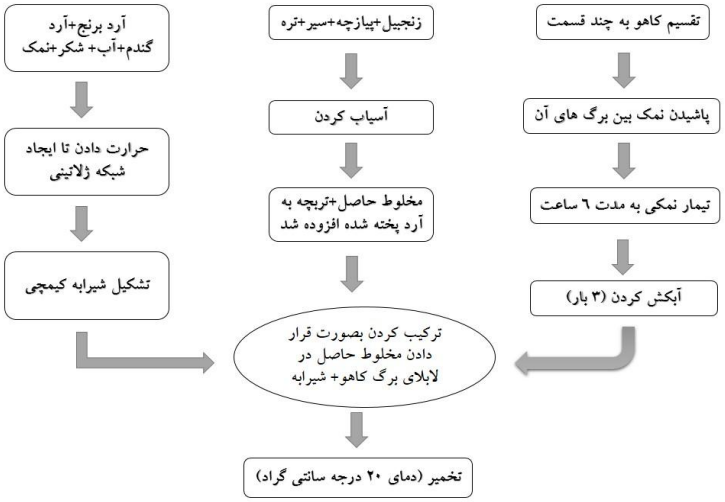
میکروارگانیسم‌هایی که تخمیر کیمچی را انجام می‌دهند باید نمک و اسیدیته بالا و شرایط بی‌هوازی را تحمل کرده و نسبت به مواد ضدمیکروب طبیعی اجزای تشکیل‌دهنده کیمچی مقاوم باشند. میکروارگانیسم‌های اصلی شرکت‌کننده در تخمیر کیمچی، باکتری‌های اسید لاکتیک هستند (۶). عوامل مختلفی مانند غلظت نمک، دما، pH، جمعیت میکروبی و تماس با هوا، فرآیند تخمیر را کنترل می‌کنند. فرآیند نمک سودکردن، آب اضافی را از طریق فشار اسمزی از مواد اولیه تولید کیمچی گرفته و مانع رشد باکتری‌های مضر می‌شود. علاوه بر این، نمک‌سودکردن شرایط نسبتاً مناسبی برای باکتری‌های اسید لاکتیک به‌وجود می‌آورد. این محصول فعالیت‌های ایمنی را افزایش و روند پیرشدن را کاهش داده و از یبوست نیز جلوگیری می‌کند، علاوه بر این، کیمچی مکمل طعم سبزیجات بوده و مانند ماست یک غذای پروبیوتیک است (۶). مواد غذایی مفید و سلامتی‌زا برای تأمین نیازهای غذایی بشر از دیرباز مورد توجه بوده است که در این بین غذاهای تخمیری جایگاه ویژه‌ای دارند. جهت انجام تکنولوژی تخمیر، وجود باکتری‌های اسید لاکتیک ضروری است. این پژوهش با هدف بررسی کیمچی تولیدشده در ایران از نظر وجود خانواده باکتری‌های اسید لاکتیک، همچنین بررسی تنوع سویه‌های موجود و شناسایی گونه‌های دارای پتانسیل پروبیوتیکی انجام شد که در نهایت، جدایه‌های شناسایی‌شده در قالب یک بانک برای تحقیقات آینده نگهداری خواهند شد.

روش بررسی

مواد اولیه تولید کیمچی (شامل: کلم چینی، ترب سفید، پودر فلفل قرمز، زنجبیل، عصاره ماهی و میگو، سیر، پیازچه، تره‌فرنگی، شکر، آرد برنج، آرد گندم و نمک)، از بازارهای محلی در شهر مشهد خریداری شد. مراحل تولید کیمچی به‌صورت شماتیک در شکل شماره ۱ آورده شده است. زمان تخمیر در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد، ۷۲-۴۸ ساعت می‌باشد (۷).

Archive of SID

www.SID.ir

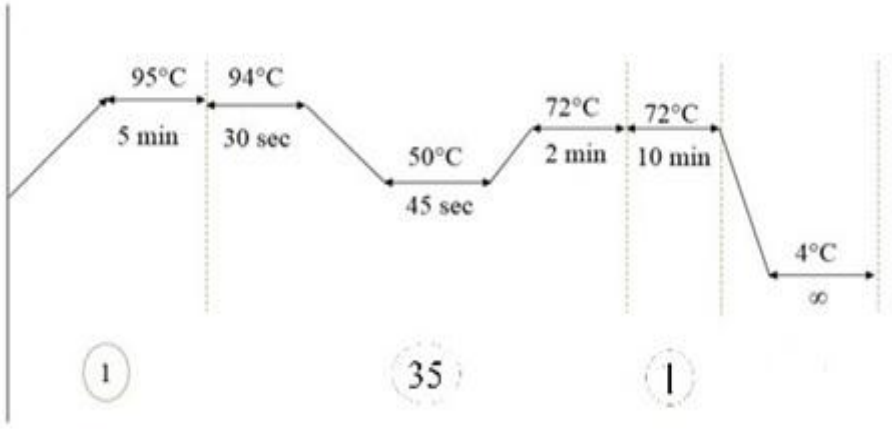


شکل شماره ۱: مراحل تولید کیمچی

پس از گذشت ۴۸- ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری و شمارش پرگنه‌ها، از پلیت‌های (de Man Rogosa and Sharpe agar) MRS (ساخت مرک آلمان) حاوی بالاترین رقت ($۱۰^{-۸}$-$۱۰^{-۶}$)، براساس تفاوت در ویژگی‌های مورفولوژی (رنگ، شکل، تحدب و تعقر پرگنه و عمقی یا سطحی بودن پرگنه) چند پرگنه انتخاب و در محیط کشت MRS آگار (جهت خالص‌سازی بیشتر و رسیدن به تک‌کلنی) در سه تکرار، کشت خطی داده شد و به مدت ۴۸- ۲۴ ساعت، پلیت‌ها در دماهای ۳۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد، در حالت بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. برای توالی‌یابی و شناسایی دقیق ایزوله‌ها به روش مولکولی، تکثیر ژن 16S rRNA که براساس نواحی محافظت‌شده این ژن عمل می‌کند، انجام گرفت. برای واکنش PCR نیز از پرایمرهای عمومی ذیل استفاده گردید. طول قطعه تکثیریافته، ۱۵۰۰ جفت بازی بود و شرایط واکنش PCR مطابق شکل شماره ۲ انجام شد (۸).

پرایمر Forward: 27FYM با توالی (5′- AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3′)

پرایمر Reverse: 1492R با توالی (5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′):



شکل شماره ۲: پروفایل برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر 16S rRNA

www.SID.ir

برای بررسی مقاومت به اسید، پس از فعال‌سازی ایزوله‌های موردنظر و به‌منظور رشد بهتر کلنی‌ها، در محیط MRS براث برای یک شب (۱۸ ساعت) کشت و گرمخانه‌گذاری انجام گرفت. سپس به‌منظور خالص‌سازی، بیومس حاصل از رشد باکتری‌ها و حذف MRS براث، عمل سانتریفوژ (دمای ۴ درجه سانتیگراد، به مدت ۵ دقیقه، با دور g×۱۰۰۰۰) انجام شد. به‌منظور حذف کامل MRS براث، یک مرحله شست‌وشو به‌وسیله محلول بافر فسفات (PBS) با pH=۷/۲ استریل صورت گرفت و پس از انجام سانتریفوژ مجدد، سوپرناتانت دور ریخته شد. بعد از این مرحله، رسوب تشکیل‌شده در محلول PBS استریل حل شد، به میزانی‌که جذبی معادل محلول ۰/۵ مک‌فارلند داشته باشد. (محلول ۰/۵ مک‌فارلند در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذبی معادل CFU/ml $۱۰^{۸}$×۱/۵-۱ دارد.) در این مرحله، به‌منظور انجام آزمایش مقاومت به اسید، حدود ۱٪ از محلول تهیه‌شده در مرحله قبل به محیط‌های کشت MRS براث دارای pHهای مختلف (۲، ۳ و ۷) تلقیح شد. لازم به ذکر است به‌منظور اسیدی‌کردن محیط‌های کشت مذکور، از اسید کلریدریک ۱ نرمال استفاده گردید. سپس به‌منظور بررسی میزان مقاومت باکتری‌های مورد نظر به pHهای مختلف، از محیط‌های کشت دارای pHهای مختلف اسیدی، نمونه‌برداری شد و روی محیط کشت MRS آگار، کشت خطی داده شد که به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه تحت دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و شرایط بی‌هوازی قرار گرفتند. پس گذشت این زمان، شمارش باکتری‌های رشدیافته، نشان‌دهنده میزان رشد باکتری‌ها و مقاومت آنها به شرایط اسیدی بود (۱۰،۹). درجه زنده‌مانی سویه‌ها از طریق مقایسه درصد کلنی‌های رشدکرده بر روی MRS به غلظت کلنی‌های ابتدایی محاسبه گردید. آزمایشها در سه تکرار انجام گرفت. بررسی مقاومت به نمک‌های صفراوی، بر روی آن دسته از ایزوله‌هایی صورت گرفت که توانایی بقا در آزمایش مقاومت به اسید را داشتند (۱۱). بدین منظور باکتری‌های مورد نظر جهت غنی‌سازی، به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، در محیط کشت MRS براث گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گذشت این زمان و ایجاد کدورت درون لوله‌ها، حدود ۰/۲۵ میلی‌لیتر از کدورت درون لوله‌ها برداشته شد و به همراه محلول PBS با pH=۷/۲ داخل لوله‌های از قبل استریل‌شده ریخته شد (این میزان با استفاده از روشی مشابه روش انجام‌شده در آزمایش مقاومت به اسید، با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر و مقایسه آن با جذب محلول ۰/۵ مک‌فارلند تعیین گردید.) لازم به ذکر است مشابه آزمایش مقاومت به اسیدی، دو مرحله عمل سانتریفوژ انجام شد. همچنین، محیط‌های MRS براث با درصد نمک‌های صفراوی مختلف (۰، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۵، ۱ و ۲٪) تهیه و به‌وسیله اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و تحت فشار ۱۵پوند بر اینچ مربع، استریل شدند و جذب آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد، پس از سانتریفوژ دوم و دورریختن سوپرناتانت، بر روی رسوب داخل لوله‌ها در شرایط استریل، محیط‌های کشت MRS براث دارای درصد نمک‌های صفراوی مختلف ریخته شد، به میزانی‌که پس از مخلوط‌شدن، مقدار جذب در محدوده مشخص‌شده حداقل ۰/۰۰۷ و حداکثر ۰/۰۱۵ باشد. سپس لوله‌ها در زمانهای ۰، ۲ و ۴ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. این زمان منعکس‌کننده زمان ماندگاری موادغذایی درون روده کوچک است. در این آزمایش به‌منظور بررسی مقدار تحمل باکتری‌های موردنظر به نمک‌های صفراوی، از محتویات لوله‌ها در هر تناوب زمانی، کشت سطحی به عمل آمد و پس از مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوباسیون پلیت‌ها، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و تحت شرایط بی‌هوازی، شمارش کلی کلنی‌های رشدیافته، نمایانگر مقاومت باکتری‌های مورد نظر به نمک‌های صفراوی بود (۱۲). به‌منظور تأیید فعالیت پروبیوتیکی باکتری‌های مورد نظر، ویژگی ضدباکتریایی آنها (ضدباکتری‌های پاتوژن) نیز مورد بررسی قرار گرفت.

روش مورد استفاده، Spot on Lawn بود. میکروارگانیسم‌های پاتوژن مانند *Listeria innocua* ATCC 33090، *Salmonella typhi* ATCC 6539، *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Escherichia coli* O157:H ATCC43895 به‌عنوان شاخص در آزمایش فعالیت ضدباکتریایی جدایه‌های لاکتیک انتخاب شدند. برای انجام این آزمایش، ابتدا باکتری‌های اسید لاکتیک مورد نظر و باکتری‌های پاتوژن شاخص فعال‌سازی شدند. سپس با قراردادن باکتری‌های اسید لاکتیک مورد نظر در فاز لگاریتمی (غنی‌سازی برای ۱۸ ساعت در محیط کشت MRS براث)، حدود ۵ میکرولیتر از آنها روی سطح محیط کشت BHI

Archive of SID

www.SID.ir

آگار نقطه‌گذاری و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گذشت زمان مورد نظر برای گرمخانه‌گذاری و رشد مناسب جدایه‌های لاکتیکی، سطح محیط‌های کشت به‌وسیله یک لایه آگار نرم (حدوداً ۱۰ میلی‌لیتر از آگار ۷٪+BHI) که با سویه‌های شاخص تلقیح شده بودند، پوشانده شد. در ادامه، پلیت‌ها تحت شرایط بهینه رشد میکروارگانیسم شاخص، گرمخانه‌گذاری شدند و پس از ۲۴-۸ ساعت با توجه به سرعت رشد میکروارگانیسم شاخص، خواص ضدباکتریایی آنها مشاهده گردید؛ بدین صورت‌که وجود هاله‌ای شفاف در اطراف نقاط تلقیح‌شده با باکتری‌های اسید لاکتیک مورد نظر، نشان‌دهنده عدم رشد میکروارگانیسم‌های شاخص و در نتیجه خاصیت ضدباکتریایی ایزوله‌ها بود. این آزمایش در سه تکرار برای هر جدایه در برابر هریک از باکتری‌های شاخص انجام شد (۱۳).

مقاومت به آنتی‌بیوتیک جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* که در آزمون‌های مقاومت به اسید، نمک‌های صفراوی و بررسی خاصیت ضدباکتریایی؛ مقاومت بالاتری نسبت به سایر ایزوله‌ها از خود بروز دادند، در برابر ۷ نوع آنتی‌بیوتیک مختلف ارزیابی گردید.

بدین منظور ابتدا کشت فعال جدایه تهیه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از کشت فعال، به ۴ میلی‌لیتر محیط کشت MRS، آگار نرم حاوی ۱٪ آگار افزوده و سپس آگار نرم بر سطح پلیت‌های از پیش آماده‌شده که حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MRS آگار (۱/۵٪) بودند، ریخته شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک، بر سطح آگار رویی قرار گرفتند و پلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. در طی این زمان، قطر هاله در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد و نتیجه آزمایش به‌صورت مقاوم، حساسیت نسبی و حساس گزارش گردید (۱۷-۱۴).

یافته‌ها

در این بررسی در مجموع، ۲۳ جدایه از گروه‌های مختلف انتخاب و مورد آزمون شناسایی مولکولی قرار گرفت. ابتدا DNA جدایه‌های مورد نظر استخراج شدند. در مرحله بعد با کمک پرایمرهای عمومی 27FYM و 1492R، تکثیر ژن 16S rRNA انجام گرفت. توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی (NCBI)، BLAST شده و مشابه‌ترین سویه به ایزوله موردنظر تعیین گردید. تشابه بالای ۹۷٪ به‌عنوان تشابه معنی‌دار در نظر گرفته شد. نتایج توالی‌یابی نشان داد جمعیت غالب متعلق به جنس لاکتوباسیلوس می‌باشد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: باکتری‌های اسید لاکتیک استخراج‌شده از کیمچی

ردیف	نام باکتری اسیدلاکتیک	درصد شناسایی (٪)
۱	*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*	۴۱/۱۷
۲	*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*	۹/۴۱
۳	*ویسلا سیباریا*	۲۴/۷۰
٤	*پدیوکوکوس پنتوزاسئوس*	۸/۲۳
٥	*لوکونوستوک سیترئوم*	۲/۳۵
٦	*لوکونوستوک مزنتروئیدوس*	۳/۵۲
۷	*انتروکوکوس فکالیس*	۷/۰۶
۸	*انتروکوکوس فاسیوم*	۳/۵۷

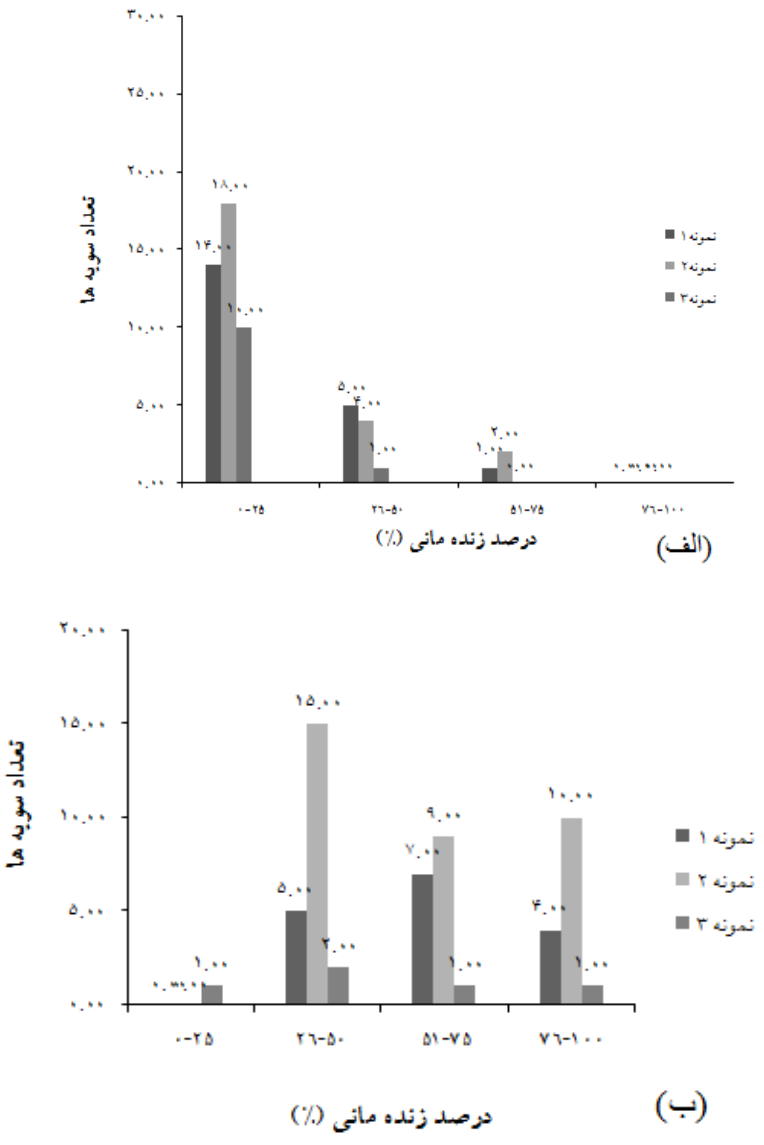
www.SID.ir
Archive of SID

از بین ۸۵ سویه جداسازی‌شده از ۳ نمونه مختلف کیمچی، ۵۵ ایزوله مربوط به جنس‌های لاکتوباسیلوس، پدیوکوکوس و لوکونوستوک انتخاب و مورد آزمون‌های مربوط به تعیین خواص پروبیوتیکی قرار گرفتند. در ادامه، نتایج مربوط به مقاومت ۵۵ جدایه به دست آمده از کیمچی در برابر اسید (pH از ۷-۲) بر سطح زنده‌مانی مورد بررسی قرار گرفت. تعدادی از سویه‌ها زنده ماندند (نمودار شماره ۱). سویه شماره A.23 متعلق به *Pediococcus pentosaceus* 25745، بیشترین مقاومت به اسید را از خود نشان داد.

این سویه توانست در pH=۲/۰ به میزان ۶۲/۲٪ زنده بماند. زمانی‌که pH به ۳/۰ افزایش یافت، بیشتر از ۲۷٪ از سویه‌ها درجه زنده‌مانی بیشتر از ۷۵٪ را از خود نشان دادند و زمانی‌که pH به ۷ رسید تمام ایزوله‌ها (۱۰۰٪) زنده ماندند. پس از انجام آزمون مقاومت به اسید، ۵ سویه شامل:

Pediococcus pentosaceus ATCC 25745,
Lactobacillus plantarumstrain PD412,
Lactobacillus fermentum IFO3956,
Lactobacillu plantarum KLDS 1.0725,
Lactobacillus plantarum WCFS1

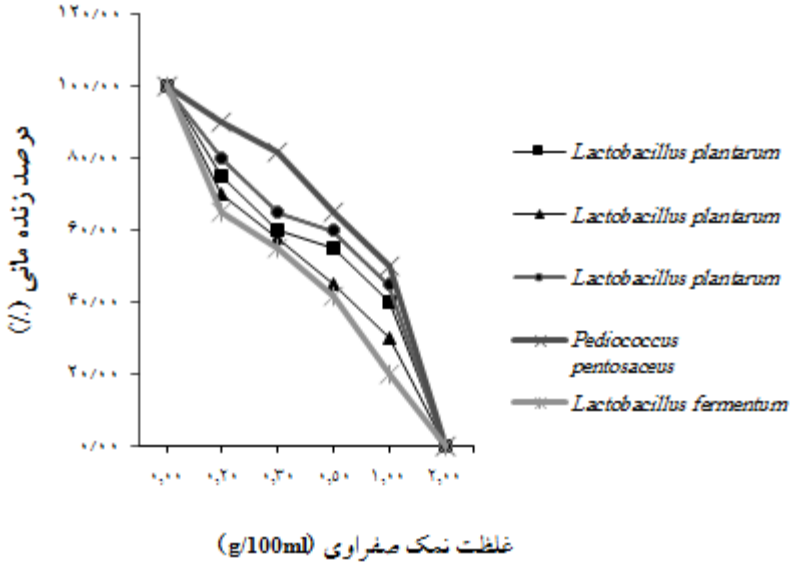
که مقاومت نسبتاً بالایی داشتند، انتخاب و آزمایشهای بعدی روی آنها انجام شد.



نمودار شماره ۱: درجه زنده‌مانی سویه‌های جداشده از نمونه‌های کیمچی در محیط کشتی با pH=۲/۰ (الف) و pH=۳/۰ (ب)

SID.ir

تمام ۵ ایزوله مورد آزمون، مقاومت نسبتاً خوبی به نمک‌های صفراوی نشان دادند. سویه ۴ که متعلق به سویه *Pediococcus pentosaceus* 25745 بود، بالاترین مقاومت را از خود نشان داد و حساس‌ترین سویه (سویه ۵) متعلق به *Lactobacillus fermentum* IFO3956 بود (نمودار شماره ۲). با افزایش غلظت نمک صفراوی، رشد باکتری‌های اسید لاکتیک نیز به‌صورت تدریجی کاهش یافت.



نمودار شماره ۲: تأثیر غلظت‌های متفاوت نمک صفراوی بر روی زنده‌مانی سویه‌های جداسازی‌شده از کیمچی

دو جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، فعالیت بازدارندگی بسیار بالایی از خود نشان دادند. باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* نیز پس از این دو جدایه، دارای هاله بازدارندگی قابل‌قبولی بودند. یکی از سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مورد بررسی، هاله‌های بازدارندگی ضعیف‌تری نسبت به ۴ سویه دیگر تشکیل دادند (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: قطر هاله بازدارندگی باکتری‌های اسید لاکتیک (برحسب میلی‌لیتر) بر باکتری‌های شاخص

ردیف	باکتری‌های اسید لاکتیک	*استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923	*لیستریا اینوکوآ* ATCC 33090	*اشرشیا کلی* ATCC 25922	*اشرشیا کلی* ATCC 43895	*سالمونلا تیفی* ATCC 6539
۱	*پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* ATCC 25745	۱۱/۳۵±۰/۳۵	۱۸/۱۵±۰/۱۸	۱۴/۱۲±۰/۱۳	۱۶/۸۵±۰/۲۲	۱۲/۱۲±۰/۳۰
۲	*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* WCFS1	۱۸/۲۱±۰/۱۴	۱۵/۳۲±۲۲	۱۷/۱۲±۰/۳۱	۱۸/۱۰±۰/۱۴	۱۶/۵۸±۰/۲۹
۳	*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PD412	۲۰/۰۳±۰/۴۱	۱۸/۲۸±۰/۲۲	۱۸/۰۱±۰/۳۰	۱۹/۹۰±۰/۰۹	۱۷/۵۲±۰/۲۰
٤	*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* KLDS 1.0725	۱۱/۰۸±۰/۲۷	۱۰/۴۵±۰/۳۹	۱۵/۱۲±۰/۴۱	۱۶/۱۰±۰/۲۵	۱۲/۳۲±۰/۲۵
۵	*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* IFO3956	۱۸/۲۸±۰/۲۱	۱۱/۱۰±۰/۳۰	۱۳/۲۰±۰/۱۲	۱۴/۵۶±۰/۰۴	۱۲/۵۳±۰/۲۰

جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نسبت به بازدارنده سنتز دیواره سلولی، به‌خصوص کوآموکسی‌کلاو و تتراسایکلین حساس بود، ولی در برابر بازدارنده سنتز نوکلئیک اسید نظیر ونکومایسین و اریترومایسین کاملاً مقاوم و در برابر پنی‌سیلین، جنتاماسین و آموکسی‌سیلین، مقاومت نسبتاً خوبی نشان داد (جدول شماره ۳).

www.SID.ir

جدول شماره ۳: بررسی واکنش سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها

سویه	حساس	حساسیت نسبی	مقاوم
لاکتوباسیلوس پلانتاروم **PD412**	کوآموکسی‌کلاو (۳۰میکروگرم) تتراسایکلین (۳۰میکروگرم) اریترومایسین (۱۵میکروگرم)	پنی‌سیلین (۱۰میکروگرم) جنتاماسین (۱۰میکروگرم) آموکسی‌سیلین (۲۵میکروگرم)	ونکومایسین (۳۰میکروگرم)
پدیوکوکوس پنتوزاسئوس **ATCC 25745**	کوآموکسی‌کلاو (۳۰میکروگرم) اریترومایسین (۱۵میکروگرم)	آموکسی‌سیلین (۲۵میکروگرم) تتراسایکلین (۳۰میکروگرم) جنتامایسین (۱۰میکروگرم)	ونکومایسین (۳۰میکروگرم) پنی‌سیلین (۱۰میکروگرم)

بحث

از بین سویه‌های مورد آزمون، پدیوکوکوس‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها، قابلیت‌های بالایی از لحاظ بروز ویژگی‌های پروبیوتیکی از خود نشان دادند، به‌گونه‌ای‌که بیشترین پتانسیل پروبیوتیکی متعلق به سویه‌های *Lactobacillus plantarum* PD412 و *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 بود. جنبه‌های ایمنی مصرف این باکتری‌ها، از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک، نشانگر این است که این دو باکتری واجد مقاومت طبیعی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. بررسی‌ها نشان می‌دهد محصولات تولیدشده به روش تخمیری و سنتی، منابع بسیار مناسبی برای باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشند. از این‌رو، شناسایی و بررسی خاصیت سلامتی‌زایی این سویه‌ها، همچنین استفاده از آنها در محصولات غذایی صنعتی می‌تواند این امکان را به مصرف‌کنندگان بدهد که راههای جدیدی برای بهره‌مندی از سلامتی بیابند؛ زیرا مصرف این دسته از باکتری‌ها، سلامت دستگاه گوارش را بهبود بخشیده و سیستم ایمنی بدن را تقویت می‌کند. همچنین استفاده بلندمدت از محصولات حاوی این سویه‌ها، اثرات بسیار مفیدی در فرد مصرف‌کننده برجا می‌گذارد (۳،۲). در این پژوهش، باکتری‌های اسید لاکتیک (از جنس ویسلا، لاکتوباسیلوس، لوکونوستوک و پدیوکوکوس) قبل از شروع تخمیر در فرآورده‌ها حضور داشتند. در این بین، باکتری‌های هتروفرمنتاتیوی همچون *لوکونوستوک* و *ویسلا* که غالب بودند با تولید اسید لاکتیک، اسیداستیک و دی‌اکسیدکربن؛ آغازکننده تخمیر بودند. در مراحل بعدی تخمیر و به مرور، سویه‌های هوموفرمنتاتیو جایگزین سویه‌های هتروفرمنتاتیو شدند. درصد پایین جدایه‌هایی که به‌عنوان لوکونوستوک شناسایی شدند، می‌توانست به دلیل توانایی رقابت پایین اعضای این جنس با سایر باکتری‌های اسید لاکتیک و نیز عدم توانایی رشد در pHهای پایین باشد. همچنین می‌توان رشد کم این جنس بر روی محیط انتخابی و در نتیجه دشواری جداسازی آن را نیز یکی دیگر از دلایل حضور کم‌رنگ این جنس دانست (۱۸).

در این مطالعه، تأثیر pH (از ۷-۲) بر سطح زنده‌مانی ۵۵ جدایه به‌دست‌آمده از کیمچی مورد بررسی قرار گرفت. در نمودار شماره ۱ تعداد سویه‌هایی که زنده ماندند و درجه زنده‌مانی آنها، نشان داده شده است. طبق این نمودار، اکثرسویه‌ها توانسته‌اند در حدود کمتر از ۵۰٪ در pH=۲/۰ زنده بمانند. سویه شماره A.23 که متعلق به *Pediococcus pentosaceus* 25745 است، بیشترین مقاومت به اسید را از خود نشان داده است. این سویه توانسته در pH=۲/۰ به میزان ۶۲/۲٪ زنده‌مانی داشته باشد. گزارش شده است اسیدهای مختلفی از جمله هیدروکلریدریک اسید در معده انسان وجود دارد که وظیفه آن تجزیه درشت مولکول‌های زیستی و سلول‌هایی نظیر پروتئین، ویتانین و اسیدهای چرب می‌باشد (۱۹). سویه‌های پروبیوتیکی قدرتمند نیز در pH=۳/۰ زنده‌مانی دارند (۲۰). Barakat و همکاران (سال ۲۰۱۱) گزارش دادند مقاومت بالای بعضی باکتری‌ها نسبت به pH پایین می‌تواند به‌علت تولید ترکیباتی مانند پلی‌ساکاریدها باشد که مانع از اثر اسید بر روی غشای سلولی آنها می‌شود (۲۱). Sahadeva و همکاران (سال ۲۰۱۱)، Boke و همکاران (سال ۲۰۱۰) نیز عنوان کردند زنده‌مانی تمامی ایزوله‌ها به‌طور معنی‌داری در pH=۲/۰ نسبت به pH=۳/۰ و pH=۷/۰ کاهش می‌یابد (۲۳،۲۲). برای ارزیابی پتانسیل باکتری‌های اسید لاکتیک جهت معرفی آنها به‌عنوان سویه‌های پروبیوتیک، بررسی مقاومت آنها به نمک‌های صفراوی ضروری است. اگزال (Oxgall) یک ترکیب طبیعی مربوط به صفرای گاو بوده که دربرگیرنده نمک‌های صفراوی مزدوج و غیرمزدوج می‌باشد (۲۱).

www.SID.ir

نتایج نشان می‌دهد تمام ۵ ایزوله مورد آزمون، مقاومت نسبتاً خوبی به نمک‌های صفراوی داشته‌اند. در مطالعه حاضر، سویه ۴ متعلق به *Pediococcus pentosaceus* 25745، بالاترین مقاومت را از خود نشان داد و حساس‌ترین سویه (سویه ۵) متعلق به *Lactobacillus fermentum* IFO3956 بود. اثر محافظتی ماتریکس ماده غذایی می‌تواند به‌عنوان عاملی جهت افزایش مقاومت باکتری‌ها نسبت به نمک صفراوی در نظر گرفته شود (۲۴). یکی دیگر از عوامل مهمی که در افزایش مقاومت سویه‌ها نسبت به نمک صفراوی تأثیرگذار است، اثر فعالیت هیدرولیز نمک‌های صفراوی (Bile Salt Hydrolase, BSH) می‌باشد (۲۳). Chiu و همکاران (سال ۲۰۰۷)، به بررسی مقاومت به نمک صفراوی سویه‌های *Pediococcus pentosaceuS* و *Lactobacillus plantarum* استخراج‌شده از سبزی‌های تخمیری پرداختند، بدین صورت‌که جدایه‌های مورد نظر را به مدت ۳ ساعت در محیط MRS براث حاوی ۰/۳٪ نمک صفرا قرار دادند و پس از تهیه کشت سطحی از هرکدام از نمونه‌ها و قرار دادن پلیت‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت (تحت شرایط بی‌هوازی)، و شمارش کلنی‌های رشدیافته، به این نتیجه دست یافتند که باکتری‌های مذکور به‌خوبی قابلیت زنده‌مانی و رشد در این شرایط را داشته‌اند (۱۲). همچنین در یک تحقیق دیگر، Masuda و همکاران (سال ۲۰۱۰)، قابلیت ماندگاری *Lactobacillus plantarum*، *Lactobacillus paraplantarum* و *Leuconostocmesenteroides* استخراج‌شده از زیتون تخمیری در محیط کشت MRS براث حاوی ۱-۰/۵٪ نمک صفراوی را مورد بررسی قرار دادند. بدین منظور باکتری‌های مذکور در زمانهای صفر، ۱، ۲ و ۴ ساعت در محیط کشت حاوی نمک صفراوی قرار گرفتند و پس از آن، از نمونه‌ها بر روی MRS آگار کشت خطی داده شد. در مرحله بعد، پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت و در شرایط بی‌هوازی، نتایج حاصله، حاکی از مقاومت و ماندگاری باکتری‌های مذکور در شرایط آزمایشگاهی بود (۲۵). همان‌طورکه از نتایج مندرج در جدول شماره ۳ استنباط می‌شود، دو جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، فعالیت بازدارندگی بسیار بالایی داشته‌اند و باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* نیز پس از این دو جدایه، دارای هاله بازدارندگی قابل‌قبولی بوده‌اند. Sieladie و همکاران (سال ۲۰۱۱)، قابلیت بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی مشابه جداشده از ۱۰ نمونه سوسیس تخمیری را بر *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی کردند که به نتایج مشابهی نیز دست یافتند (۲۶). در تحقیق دیگری که توسط علامه و همکاران (سال ۲۰۱۲) انجام شد، جدایه *لوکونوستوک مزنتروئیدوس زیرگونه مزنتروئیدوس* استخراج‌شده از نوعی ماهی تخمیری، فعالیت ضدباکتریایی خوبی در برابر شاخص‌های بیماری‌زای *آئروموناس هیدروفیلا*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *شوانلا پوتریفاسین*، به روش Well Diffusion، نشان داد (۹).

در پژوهش Erdougrul و همکاران (شال ۲۰۰۶)، مقاومت جدایه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی*/*لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* جداشده از انواع ماست، پنیر و تارهانا در برابر انواع آنتی‌بیوتیک‌ها (مانند توبرامایسین، سفالوتین، ونکومایسین و آمپی‌سیلین) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، بیانگر مقاومت باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در برابر تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی بود (۲۷). از این‌رو در اکثر مطالعات روش‌های مبتنی بر کشت، از آنتی‌بیوتیک ونکومایسین به‌عنوان محیط اختصاصی برای رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* در حضور سایر جنس‌های لاکتوباسیل، استفاده می‌شود (۲۸). در میان انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت به ونکومایسین از جمله مهم‌ترین ویژگی‌های باکتری‌های پروبیوتیک به شمار می‌رود. دلیل این پدیده، به‌واسطه عملکرد ویژه ونکومایسین در برابر عفونت‌های حاد ناشی از پاتوژن‌های مقاوم به داروهای ترکیبی می‌باشد (۲۹).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش از محصول کیمچی تولیدی در داخل ایران، باکتری‌هایی با پتانسیل پروبیوتیکی، شناسایی و جداسازی شد. براساس یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت این ۵ سویه ذکرشده کاندیداهای مناسبی برای سویه‌های پروبیوتیکی هستند. هرچند در بین این سویه‌ها *Lactobacillus plantarum* PD412 و *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745، پتانسیل پروبیوتیکی بالاتری دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

با توجه به خواص سلامتی‌زایی بالای سویه‌های دارای پتانسیل پروبیوتیکی جداشده در این پژوهش و در صورت بررسی خصوصیات تکنولوژیکی می‌توان از این باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده به‌عنوان سویه‌های کاربردی در صنایع غذایی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله علمی- پژوهشی حاصل طرح پژوهشی (با کد ۲/۲۰۱۸۹) مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. نویسندگان مقاله برخود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت‌های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی و از آقای مهندس آرش قیطران‌پور و خانم مهندس شهناز افشاریان که در انجام آزمایشها ما را یاری نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

References:

1. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics; Growth promoting factors produced by microorganisms. Science 1965;147(3659):747-8.

2. Scherezenmeir J, de Verse M. Probiotics, and synbiotics-approaching a definition. Am J Clin Nutr 2001,73(2):361-4.

3. Morelli L. In vitro selection of probiotic lactobacilli: Acritical appraisal. Curr Issues Intest Microbiol 2000;1(2):59-67.

4. Gasson MJ, de Vos W. Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. London: Blakie Academic and Professional; 1994. p. 14-15.

5. Tamime AY. Probiotic dairy products. New York: Black well; 2005.

6. Tabatabaei Yazdi F, Mohebbi M, Mortazavi SA, Alizadeh Behbahani B, Ghaitaranpour A, Jouki M. Isolation, identification and comparison of lactic acid bacteria from fermented be produced in Iran Kimchi with Korean commercial samples: Introduction of a probiotic product. Sci J Biolog Sci 2013;1(6):120-25.

7. Jin-Gyu P, Jae-Hun K, Jae-Nam P, Young-Duk K, Wang-Geun K, Ju-Woon L, et al. The effect of irradiation temperature on the quality improvement of Kimchi, Korean fermented vegetables, for its shelf stability. Radiat Phys Chem 2008;77(4):497-502.

8. Sengun IY, Nielsen DS, Karapinar M, Jakobsen M. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. Int J Food Microbiol 2009;135(2):105-11.

9. Allameh SK, Daud H, Mohammad Yusoff F. Isolation, identification and characterization of Leuconostocmesenteroides as a new probiotic from intestine of snakehead fish (Channastriatus). Afr J Biotechnol 2012;11(16):3810-16.

10. Karimi R, Mortazavian AM, Amiri-Rigi A. Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. Food Microbiol 2012;29(1):1-9.

11. Vasiee AR, Tabatabaei-Yazdi F, Mortazavi A, Edalatian MR. Isolation, Identification and Characterization of Probiotic Lactobacillus spp. from Tarkhineh. Int Food Res J 2014;21(6):2487-92.

12. Chiu HH, Tsai CC, Hsih HY, Tsen HY. Screening from pickled vegetablesthe potential probiotic strains of lactic acid bacteria able to inhibit the Salmonella invasion in mice. J Appl Microbiol 2007;104(2):605-12.

13. Klayraung S, Viernstein H, Sirithunyalug J, Okonogi S. Probiotic properties of Lactobacilli isolated from thai traditional food. Sci Pharm 2008;76(3):485-503.

14. Cebeci A, Gurakan C. Properties of potential probiotic Lactobacillus plantarum strains. Food Microbiol 2003;20(5):511-18.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris CH, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. Int Diry J 2005;16(3):189-99.

16. Morelli L, Vogensen FK, Wright AV. Genetics of lactic acid bacteria. In: Salminen S, von Wright A, Eds. Lactic Acid Bacteria. New York: Marcel Dekker; 2004. p. 253.

17. Tarakci Z, Temiz H. A review of the biochemical and antimicrobial aspects of Turkish Otlu (herby) cheese. Int J Dairy Technol 2009;62(3):354-60.

18. Schleifer KH, Stackebrandt E. Molecular systematics of procaryotes. Annual Rev Microbiol 2006;37:143-87.

19. Hassanzadazar H, Ehsani A, Mardani K, Hesari J. Investigation of antibacterial, acid and bile tolerance properties of lactobacilli isolated from Koozeh cheese. Vet Res Forum 2012;3(3):181-5.

20. Fernandez M, Boris S, Barbes C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. J Appl Microbiol 2003;94(3):449-55.

21. Barakat OS, Ibrahim G, Tawfik N, El-Kholy W, Gad El-Rab A. Identification of Microbiol Res 2011;3:59-66.

22. Hatice B, Belma A, Gulcin A. The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSS) produced by yogurt starter bacteria. Arch Biol Sci 2010;62(2):323-8.

23. Sahadeva RPK, Leong SF, Chua KH, Tan CH, Chan HY, Tong EV, et al. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. Int Food Res J 2011;18(4):1515-22.

24. Begley M, Gahan CG, Hill C. The interaction between bacteria and bile. Federation Eur Microbiol Societies 2005;29(4):625-51.

25. Masuda T, Kimura M, Okada S, Yasui H. Pediococcuspentosaceus Sn26 inhibits IgE production and the occurrence of ovalbumin-induced allergic diarrhoea in mice. Biosci Biotechnol Biochem 2010;74(2):329-35.

26. Sieladie DV, Zambou NF, Kaktcham PM, Cresci A, Fonteh F. Probiotic properties of lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon. Innov Romanian Food Biotechnol 2011;9(12):12-28.

27. Ozlem E, Erbulur F. Isolation and characterization of lactobacillus bulgaricus and lactobacillus casei from various foods. Turk J Biol 2006;30(1):39-44.

28. Vindorela CG, Reinheimer JA. Enumeration of lactobacillus casei in the presence of L. Acidophilus, bifidobacterium and lactic acid starter bacteria in fermented dairy products. Int Dairy J 2000;10(4):271-5.

29. Johnson AP, Uttley AH, Woodford N, Geoge RC. Resistance to vancomycin and teicoplanin: An emerging clinical problem. Clin Microbiol Rev 1990;3(3):280-91.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi Produced in Iran

Farideh Tabatabaei Yazdi[1*]; Alireza Vasiee[2]; Behrooz Alizadeh Behbahani[2]; Seyed Ali Mortazavi[3]

[1]Associate Professor of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

[2]PhD Student of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

[3]Professor of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

***Corresponding Author:**
Farideh Tabatabaei Yazdi,
Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Email:
tabatabai@um.ac.ir

Received: 27 Sep, 2014

Accepted: 2 Nov, 2014

Abstract

Background and Objectives: Probiotics refers to a group of microorganisms, which when exist in an appropriate amount in the gastrointestinal tract can have beneficial effects on host. Due to their duced consumption of traditional fermented food, where by the possibility of loss of many probiotic strains exist, isolation and identification of these bacteria from traditional and healthful food products seem necessary. Kimchi is a fermented food, which seems to have probiotic strains. In this study, the probiotic potential of strains isolated from kimchi was investigated.

Methods: To determine the probiotic properties of the mentioned strains, confirmatory tests, including resistance to acid (pH= 2, 3, and 7), resistance to bile salts (percentage, 0, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, and 2.0), antibacterial activity, and finally resistance of the studied strains to some common antibiotics were performed.

Results: In this study, out of 55 tested isolates, *Pediococcus* and *Lactobacillus* showed good probiotic properties, so that maximum probiotic potential belonged to *Lactobacillus plantarum* strain PD412 and *Pediococcus pentosaceus* strain ATCC 25745.

Conclusion: In this study, safety aspects of using these bacteria, in terms of resistance to antibiotics, indicated that these two bacteria have natural resistance to antibiotics. Therefore, considering high probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from kimchi, it is recommended that this food be used as a probiotic supplement.

Keywords: Kimchi; Probiotics; Lactobacillus; Pediococcus, Iran.

www.SID.ir