



DOI: 10.22034/FR.2021.42303.1768

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

محمد نوشاد<sup>\*</sup>، بهروز علیزاده بهبهانی<sup>۱</sup> و محمد حجتی<sup>۱</sup>

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

<sup>۱</sup> به ترتیب استادیار، استادیار و استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ایران

\*مسئول مکاتبات: Email: noshad@asnruk.ac.ir

### چکیده

زمینه مطالعاتی: باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند علاوه بر اثرات مفیدی که بر سلامتی مصرف‌کنندگان ایجاد می‌کنند، ویژگی‌های متعدد تکنولوژیکی و ضد میکروبی در ارتباط با استفاده‌های غذایی نیز داشته باشند. هدف: هدف از این پژوهش بررسی پتانسیل پروبیوتیکی، تکنولوژیکی و ضد میکروبی سویه‌های اسید لاکتیک جدا شده 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 ضد میکروبی سویه‌هایی که ویژگی‌های پروبیوتیکی و تکنولوژیکی بهتری داشتند علیه ۵ پاتوژن شاخص غذایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج: سویه‌های لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوبا سیلوس دلبروکی زمانی که 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 پلانتروم بود. بد شترین میزان خود تجمعی مربوط به پدیوکوکوس پنتوزا سنئوس بود. بیشترین فعالیت هم‌تجمعی علیه اشرشیاکلی مربوط به لاکتوبا سیلوس پلانتروم با ۶۷/۳ درصد بود. هم‌چنین فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های لاکتوبا سیلوس پلانتروم، لاکتوبا سیلوس دلبروکی و پدیوکوکوس پنتوزا سنئوس علیه پاتوژن‌های اشرشیاکلی، 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 اشرشیاکلی مشاهده شد. نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به نتایج به دست آمده باکتری‌های لاکتوبا سیلوس دلبروکی و پدیوکوکوس پنتوزا سنئوس خصوصیات مناسبی جهت استفاده به‌عنوان کشت الحاقی برای تولید محصولات تخمیری لبنی از خود نشان دادند.

واژگان کلیدی: باکتری‌های اسید لاکتیک، پروبیوتیک، فعالیت ضد میکروبی، نوشیدنی لبنی

## مقدمه

بشر به صورت 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 آن‌ها 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 فراورده‌های لبنی محلی و تخمیری، سبزی‌های تخمیری، گوشت، سیلاژ، خمیر ترش، نوشیدنی‌های تخمیری، فاضلاب‌ها، گیاهان و حتی 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*<sup>۱</sup>، *لاکتوکوکوس*<sup>۲</sup>، *پدیوکوکوس*<sup>۳</sup> و *لاکتوباسیلوس*<sup>۴</sup> 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 معمولاً به عنوان ارگانیسم‌هایی که مصرف بالایی در مواد غذایی دارند، شناخته می‌شوند که با دارا بودن ویژگی‌های اختصاصی، می‌توانند به عنوان کشت‌های محافظ استفاده شوند (وو و همکاران ۲۰۱۷). در سال ۱۹۰۶ الی متچینکوف<sup>۵</sup> برندهٔ جایزه نوبل و

مبتکر پروبیوتیک به معنای رایج امروزی، نخستین بار نظریه خود مبنی بر اثرات سلامتی‌بخش باکتری‌های اسید لاکتیک را مطرح کرد. بر اساس نظریه او مواد سمی و باکتری‌های عفونت‌زا در دستگاه گوارش انسان عامل تسریع‌کننده 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 بی‌ضرری 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*<sup>۶</sup> نیز می‌توانند در این تعریف طبقه‌بندی شوند. از مخمرها نیز *ساکارومیسس سرویزیه*<sup>۷</sup> و *ساکارومیسس بولاردی*<sup>۸</sup> 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 میکروارگانیسم‌ها می‌شد. پس از آن باکتری‌های 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 بیماری‌های عفونی

<sup>۵</sup>Élie Metchnikoff<sup>۶</sup>*Streptococcus*<sup>۷</sup>*Saccharomyces cerevisiae*<sup>۸</sup>*Saccharomyces boulardii*<sup>۱</sup>*Leuconostoc*<sup>۲</sup>*Lactococcus*<sup>۳</sup>*Pediococcus*<sup>۴</sup>*Lactobacillus*

تکنولوژیکی (فعالیت اسیدیفیکاسیون، اتولیتیک، مقاومت به حرارت) آن‌ها تعیین شد و در نهایت فعالیت ضد میکروبی سویه‌ها علیه باکتری‌های پاتوژن شاخص غذایی مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش

#### جداسازی و شناسایی سویه‌های لاکتیکی توسط

#### تکثیر ژن 16S rRNA

سویه‌های لاکتیکی دوغ محلی شهرستان بهبهان توسط تکثیر ژن 16S rRNA به وسیله واکنش زنجیرهای پلیمرز شناسایی شدند. ابتدا ۸۵ ایزوله گرم مثبت و کاتالاز منفی جدا شده از محیط کشت با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و تخمیر قند گروه‌بندی شده و از هر گروه یک نماینده جهت انجام آزمون شناسایی مولکولی انتخاب شد (حجتی و همکاران ۲۰۲۰). نتایج توالی‌یابی نشان داد این سویه‌ها متعلق به *لاکتوباسیلوس پلانِتاروم*، *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس دلبروک*، *لاکتوباسیلوس پنتوسوسوس*، *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* و *انتروکوکوس فاسیوم* می‌باشد. در ادامه، سویه‌هایی که شناسایی مولکولی آن‌ها انجام شده بودند، جهت انجام آزمون‌های بعدی انتخاب شدند.

#### ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی

زنده‌مانی در شرایط شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش

برای بررسی مقاومت باکتری‌ها، به شرایط اسیدی، توانایی زنده‌مانی آن در pH های ۲/۵، ۳/۵ و ۵ مورد بررسی قرار گرفت. کشت شبانه هر باکتری در محیط MRS براث (مرک، آلمان) انجام و سپس سانتریفوژ در ۶۰۰۰rpm به مدت ۱۲ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. رسوب باکتری با PBS استریل و سرد شدت‌شو و سپس در آن حل گردید. در سه لوله فالكون مجزا حاوی PBS که pH آن‌ها با HCl

شناخته می‌شوند. فواید استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک عبارتند از تاثیر بر آنزیم‌های گوارشی و سرکوب ترکیبات القاکننده سرطان، کاهش کلسترول خون، کاهش فشار خون، بهبود و تقویت سیستم ایمنی و جلوگیری از عفونت‌ها، کاهش التهابات روده‌ای، بهبود جذب مواد معدنی و ویتامین‌ها، جلوگیری از رشد و تکثیر باکتری‌های مضر، بهبود عمل گوارش و جذب مواد غذایی، کمک به ساخت ویتامین‌های گروه B و K و کاهش آلرژی‌های غذایی (آبنی و هلوینگ ۲۰۱۹؛ حسینی‌فر و همکاران ۲۰۱۹؛ دیملوپریرو و همکاران ۲۰۱۸؛ عبا باف و همکاران ۱۳۹۹). در نظر گرفتن یک میکروارگانیسم به عنوان سویه پروبیوتیک، مستلزم انجام آزمایش‌های برون‌تنی<sup>۱</sup> و تأیید آن‌ها طی آزمایش‌های درون‌تنی<sup>۲</sup> می‌باشد. طبق قوانین سازمان بهداشت و خوار و بار جهانی، ارزیابی اولیه ویژگی‌های پروبیوتیکی هر میکروارگانیسم، در شرایط آزمایشگاهی و در چهار چوب قوانین مذکور پیش از انجام آزمایش‌های درون‌تنی، اجباری می‌باشد. در این قوانین، وجود برخی از ویژگی‌های پروبیوتیکی، ضروری و وجود برخی دیگر ترجیح دارد. انتخاب سویه‌های پروبیوتیک بر اساس سابقه تاریخی استفاده آن‌ها در مواد غذایی و بدون عوارض جانبی می‌باشد. ویژگی‌هایی که برای در نظر گرفتن یک سویه به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته می‌شوند شامل موارد ذیل هستند: زنده‌مانی باکتری در طول مراحل تهیه فراورده عملگرا، زنده ماندن در دستگاه گوارش، توانایی اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده و همچنین توانایی مقابله با عوامل بیماری‌زا. هدف از این پژوهش بررسی پتانسیل پروبیوتیکی (زنده‌مانی در شرایط اسیدی و همینطور شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده، هیدروفیلیسیته، خود و هم‌تجمعی<sup>۳</sup>) باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از دوغ محلی شهرستان بهبهان بود. همچنین ویژگی‌های

<sup>۱</sup>Auto and Co- aggregation

<sup>۱</sup> In vitro

<sup>۲</sup>In vivo

گردید ( $A_1$ ). ۴ میلی‌لیتر از سو سپانسیون هر باکتری با ۲ میلی‌لیتر n-هگزادکان<sup>۱</sup> 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 ۷۰۰۰ rpm به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب باکتری با محلول PBS شستشو و بعد در PBS حل گردید تا به  $OD_{600} = 0.6$  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 (رونیزمویانو 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 / شرشیا 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 به صورت مجزا در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و هم‌تجمعی با فرمول ذیل محاسبه شد (وسیعی و همکاران ۲۰۱۹).

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

$A_x$  = جذب باکتری اسید لاکتیک

یک مولار روی ۲/۵، ۳/۵ و ۵ (کنترل مثبت) تنظیم شده بودند، باکتری تا رسیدن به OD آن به ۰/۶ تلقیح شد. فالكون‌های 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 پیپسین 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 شبیه‌سازی 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 ۴ 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 ۴ ساعت کشت شدند و نتایج بر حسب کاهش لگاریتم CFU/ml نسبت به زمان صفر (زمان صفر: ۸ لگاریتم CFU/ml) گزارش شدند.

هیدروفوبیستی سطح سلول<sup>۱</sup>

هیدروفوبیستی سطحی به عنوان شاخصی از تمایل باکتری‌ها جهت اتصال به حلال‌های غیر قطبی مطرح می‌شود. در حقیقت، هیدروفوبیستی بالا، این پتانسیل را به آن‌ها 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 از باکتری‌ها در ۶۰۰ rpm به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس تو سب PBS استریل و سرد شستشو و مجدداً به صورت سوسپانسیون درآمدند و OD آن‌ها در ۶۰۰ نانومتر بر روی ۰/۶ تنظیم

<sup>۱</sup>n-hexadecane

<sup>۱</sup>Cell surface hydrophobicity (CSH)

حمام آب گرم مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌ها بعد از قرار گرفتن در حمام آب گرم به مدت ۱۶ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و جذب آن‌ها در طول موج ۶۰۰ 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 ۴ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. بخشی از سوپرناتانت فاقد سلول (با pH ای که به علت 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 ۴۵°C- و حرارت‌دهی در دمای ۳۲°C تحت خلا ۰/۳۸ mbar به مدت ۴۰ h). پودرهای لیوفیلیزه شده از هر دو نوع سوپرناتانت در ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل گردید و پتانسیل ضد میکروبی آن‌ها با روش انتشار در آگار مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های پاتوژن (اشرشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲، سودوموناس آئروژینوزا PTCC ۱۷۰۷، سالمونلا تایفی‌موریوم PTCC ۱۶۰۹، میکروکوکوس لوتئوس PTCC ۱۱۱۰، استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳ ATCC) با تعداد تقریبی  $10^8 \times 1/5$  CFU/ml، در محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. در پلیت‌های کشت داده شده، چاهک‌هایی با قطر ۶/۸ mm توسط انتهای پپیت استریل ایجاد و ۱۱۰ µl از سوپرناتانت اسیدی و خنثی شده باکتری وارد چاهک‌ها

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 به همراه ۰/۳ درصد عصاره مخمر و ۰/۲ درصد گلوکز کشت شدند و طی نگهداری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، تغییرات pH در زمان‌های ۳، ۶ و ۲۴ ساعت با استفاده از pH متر Lab 827 (متروم، سوییس) مورد بررسی قرار گرفت (کاندیل و ال-سودا ۲۰۱۵).

فعالیت اتولیتیکی

کشت ۱۶ 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 ۶۰۰ نانومتر معادل ۱ گردد. محلول حاصل در معرض سیکل انجمادی قرار گرفت (۲۰- درجه سانتی‌گراد، ۲۴ ساعت) سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده و در نهایت میزان فعالیت اتولیتیکی به صورت کاهش درصد جذب در ۶۰۰ نانومتر گزارش گردید (کاندیل و ال-سودا ۲۰۱۵).

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

$bs_0$  = جذب اولیه

$Abs_t$  = جذب اندازه‌گیری شده بعد از گرمخانه‌گذاری

#### مقاومت به حرارت

مقاومت حرارتی سویه‌های اسید لاکتیک به دماهای ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در

<sup>۱</sup>Müller Hinton agar

<sup>۱</sup>Cell-free supernatants (CFSs)

در جدول ۱ نشان داده شده است. مقاوم‌ترین سویه نسبت به pH ۲/۵ و ۳/۵ باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلاننتاروم، 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 پلاننتاروم 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 پلاننتاروم و لاکتوباسیلوس دلبروکی با یک واحد لگاریتمی کاهش در تعداد مقاوم‌ترین و انتروکوکوس فاسیوم با ۵ واحد کاهش در تعداد حساس‌ترین سویه معرفی شدند.

شد. سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و قطر هاله عدم رشد در اطراف هر چاهک اندازه‌گیری گردید (جنئورجیوا و همکاران ۲۰۱۵).

### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش تجزیه واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گردید. برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۶ رسم شد.

### یافته‌ها

#### ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی سویه‌ها

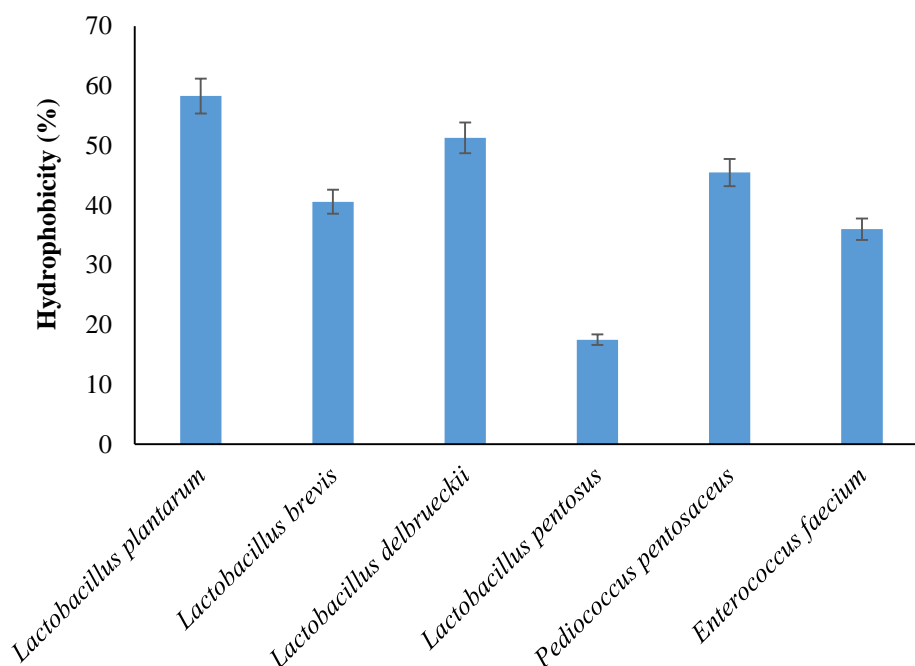
میزان زنده‌مانی باکتری‌های اسید لاکتیک در pH‌های مختلف و همچنین شرایط شبیه‌سازی شده روده و معده

جدول ۱- مقاومت سویه‌های مختلف اسید لاکتیک باکتری‌ها نسبت به شرایط اسیدی و محیط شبیه‌سازی 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)

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



شکل ۱- درصد هیدروفوبیسیته سویه‌های مختلف اسید لاکتیک باکتری‌ها

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

لاکتوباسیلوس پلاننتاروم با ۵۸/۳ درصد و کمترین میزان مربوط به سویه لاکتوباسیلوس پنتوسوس با ۱۷/۵ درصد می‌باشد.

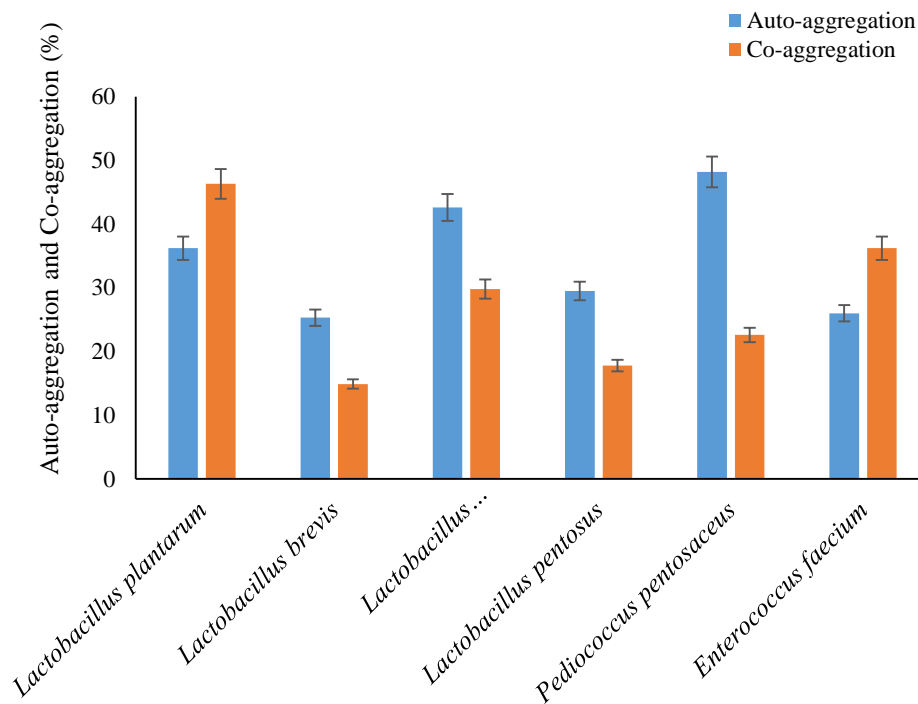
خودتجمعی مشخصه‌ای است که بر روی چسبندگی باکتری پروبیوتیک به سلول‌های روده تاثیر می‌گذارد، در حالی که هم‌تجمعی با باکتری‌های پاتوژن ویژگی است که بر روی مکانیسم آنتاگونیستی باکتری‌های پروبیوتیک که می‌توانند مانع از اتصال سویه‌های بیماری‌زا به سلول‌های روده شوند، اثرگذار است. همان‌گونه که در شکل ۲ مشخص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

آبگریزی به طور مستقیم به ظرفیت سویه‌ها برای اتصال به منابع غیرقطبی نسبت داده می‌شود. هیدروفوبیسیته توسط اجزای آبگریز موجود در غشای خارجی باکتری‌ها ایجاد شده و می‌توان از منابعی مانند زایلن، n-هگزادکان، کلروفرم<sup>۲</sup> و اتیل‌استات<sup>۱</sup> برای بررسی این ویژگی استفاده نمود. آبگریزی بر اساس مخلوط کردن سوسپانسیون باکتریایی و محلول غیرقطبی و سپس اندازه‌گیری OD<sub>600</sub> 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 هیدروفوبیسیته سویه‌ها در شکل ۱ آورده شده است. بالاترین میزان هیدروفوبیسیته مربوط به سویه

<sup>۱</sup>Ethyl acetate

<sup>۲</sup>Xylene

<sup>۳</sup>Chloroform



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

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

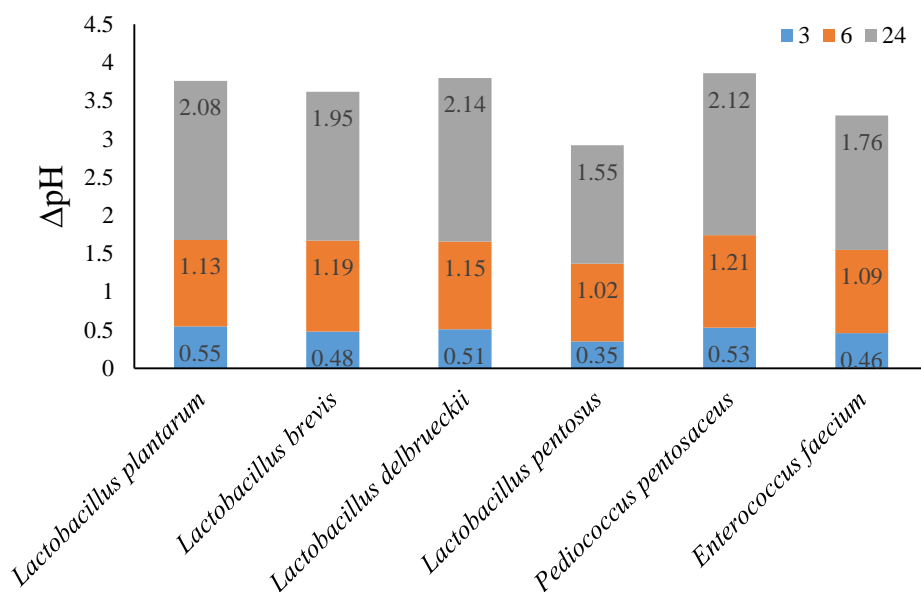
درصد جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر به صورت نمودار میله‌ای در شکل ۴ نشان داده شده است. پتانسیل باکتری‌های اسید لاکتیک بر حسب شدت اتولیز و بر مبنای درصد کاهش جذب طی فرایند اتولیز مطابق با مطالعه دعوتی و همکاران (۱۳۹۶) و آیاد و همکاران (۲۰۰۱)، به صورت زیر طبقه‌بندی می‌گردد: برای انتروکوکوس‌ها: ۲۲-۰: ضعیف؛ ۳۴-۲۴: نسبتاً خوب؛ ۶۶-۳۵: خوب و برای لاکتوباسیل‌ها: ۳۹-۰: ضعیف؛ ۶۹-۴۰: نسبتاً خوب؛ ۹۶-۷۰: خوب. بنابراین مطابق با تعریف صورت گرفته باکتری‌های انتروکوکوس فاسیوم، لاکتوباسیلیوس پنتوسوس، لاکتوباسیلیوس پلانتروم، لاکتوباسیلیوس برویس و لاکتوباسیلیوس دلبروکی از نظر پتانسیل اتولیتیکی به ترتیب در محدوده خوب، ضعیف، نسبتاً خوب، نسبتاً خوب و نسبتاً خوب قرار دارند.

#### ارزیابی خصوصیات تکنولوژیکی سویه‌ها

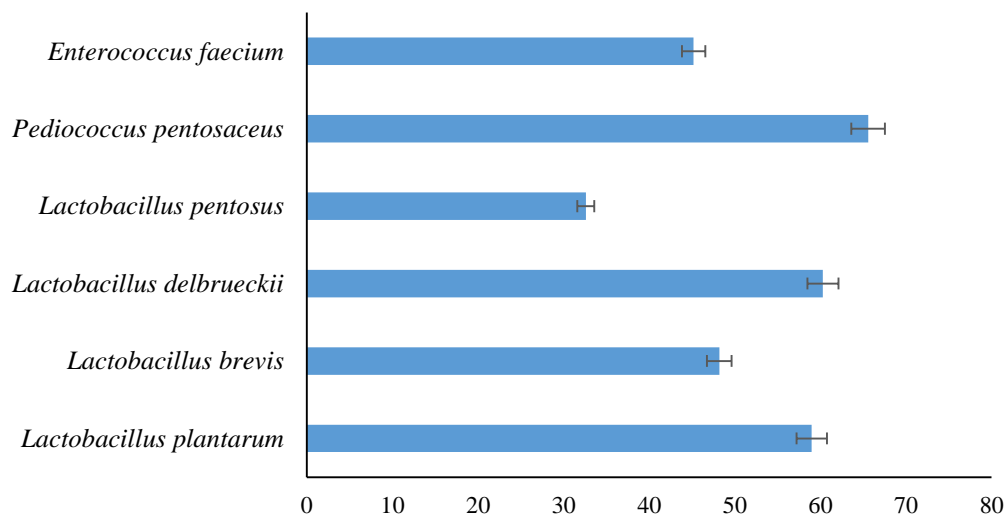
پتانسیل کاهش pH توسط سویه‌های مختلف اسید لاکتیک در شکل ۳ نشان داده شده است. یک باکتری با قدرت تخمیر مناسب باید بتواند در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و طی مدت ۳ ساعت pH ای برابر با  $5 \pm 0.2$  ایجاد کند یا تغییرات pH ایجاد شده توسط آن  $0.4$  باشد. در این مطالعه بجز سویه لاکتوباسیلیوس پنتوسوس که فاقد توانایی کاهش اسید به میزان  $0.4$  واحد بود، بقیه سویه‌ها این توانایی را دارا بودند. در طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، باکتری‌های پدیوکوکوس پنتوزا سئوس و لاکتوباسیلیوس دلبروکی بالاترین میزان تغییرات pH را ایجاد نمودند.

فعالیت اتولیتیکی جدایه‌های لاکتیکی دوغ محلی شهرستان بهبهان در طی ۴۸ ساعت به صورت کاهش





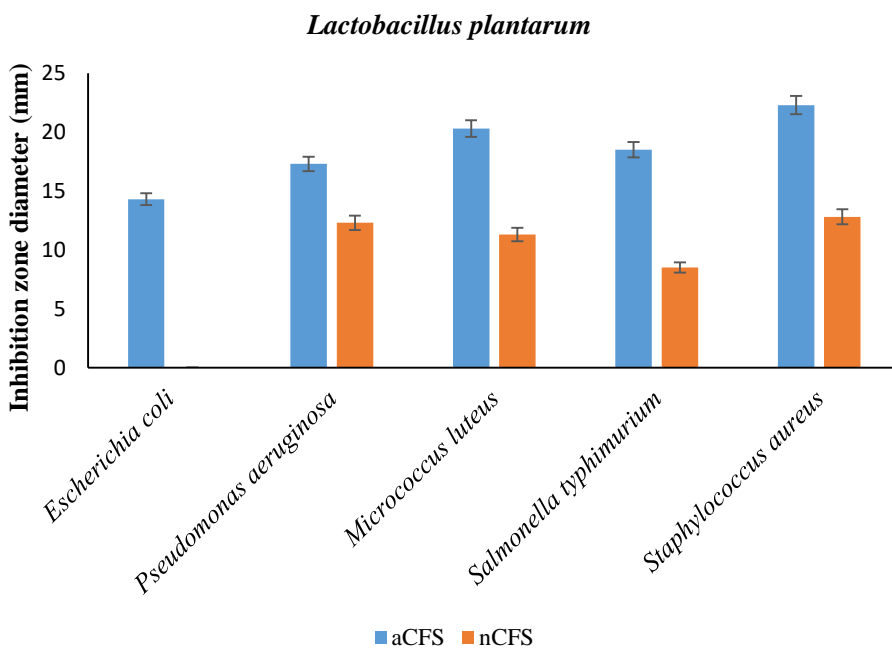
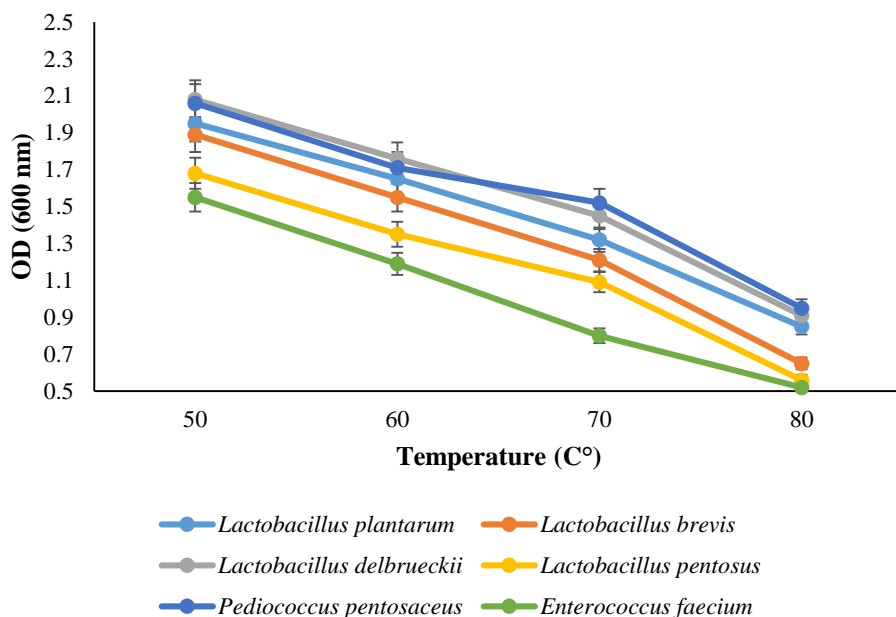
شکل ۳- تغییرات pH ایجاد شده توسط باکتری‌ها طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری  
 Figure 3- pH changes caused by bacteria during 24 hours of incubation



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)

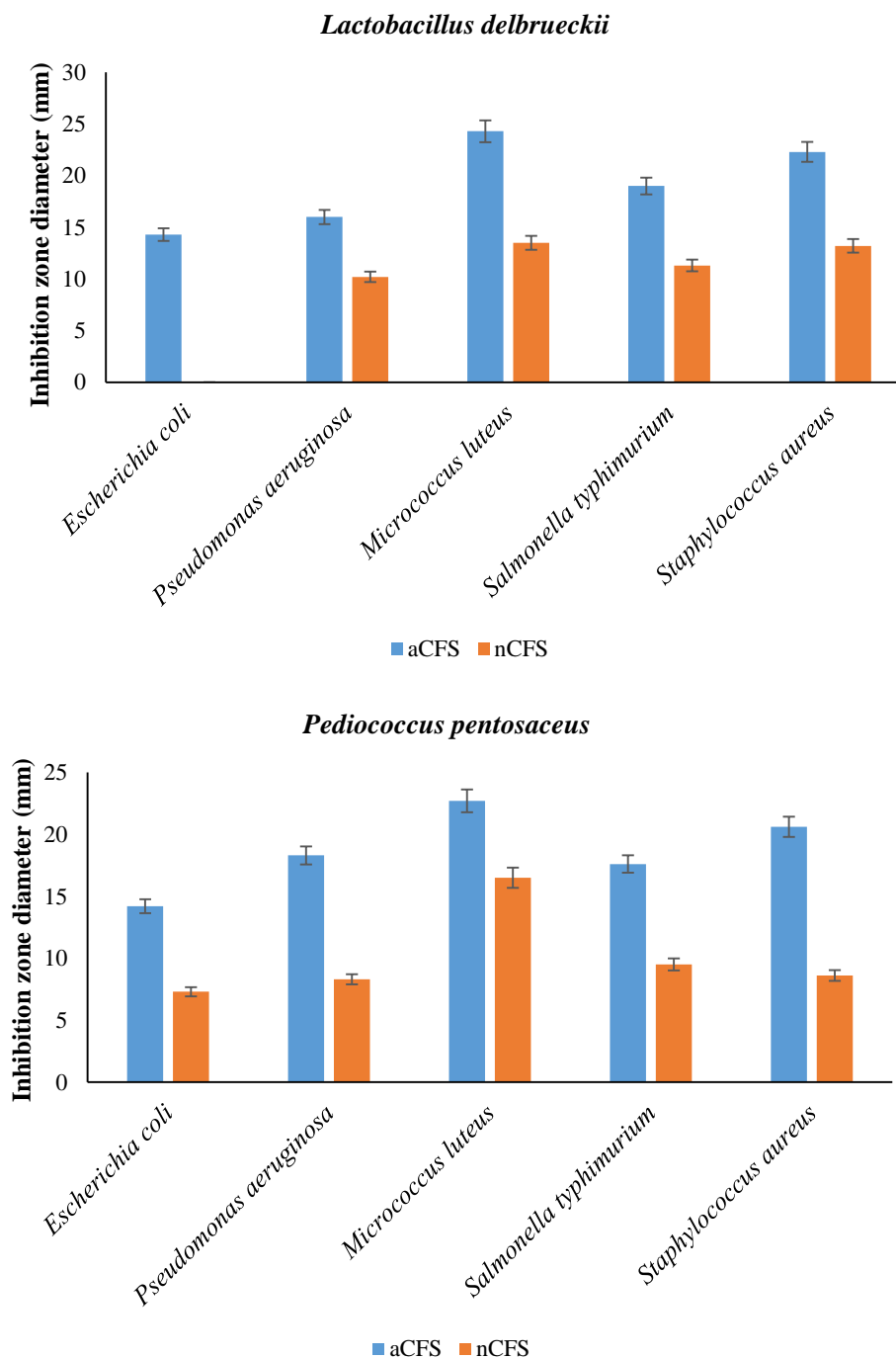
قرار گرفت. همانگونه که در شکل ۵، مشخص است بیشترین مقاومت و زنده‌مانی مربوط به باکتری‌های پدیوکوکوس پنتوزا سئوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی و کمترین زنده‌مانی مربوط به لاکتوباسیلوس پنتوسوس و انتروکوکوس فاسیوم می‌باشد.

مقاومت حرارتی باکتری‌های 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



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)



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

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

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 ۶ مشخص شده است. در همه تیمارها، سوپرناتانت

#### ارزیابی فعالیت ضد میکروبی

با توجه به این‌که باکتری‌های لاکتوباسیلوس دلبروکی، لاکتوباسیلوس پلاننتاروم و پدیوکوکوس پنتوزاسئوس نتایج پروبیوتیکی و تکنولوژیکی بهتری نسبت به بقیه

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

#### بحث

یکی از معیارهای اصلی 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 باشند که مهم‌ترین آن، pH پایین آن است که توسط اسیدکلریدریک ایجاد می‌شود. معمولاً pH زیر ۲/۵، اثر کشندگی بر باکتری‌ها دارد. اگر چه این ویژگی در نابودی میکروب‌های 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

باکتری‌ها 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 گونه‌های 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 به صورت مجزا باید مورد بررسی قرار گیرد. همچنین گزارش دادند لاکتوباسیلوس پلاننتاروم و لاکتوباسیلوس برویس نسبت به پدیوکوکوس مقاومت بالاتری نسبت به pH پایین دارد.

هیدروفوبیسیته یکی از فاکتورهای مهم برای باکتری‌ها جهت چسبندگی به سطوح مختلف جهت تاثیر قرار دادن بافت میزبان محسوب می‌گردد. هیدروفوبیسیته به فاکتورهای متعددی از قبیل نیروی واندروالس، حرکت براونی، 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 هیدروفوبیسیته آنها دارد (وسیعی و همکاران ۲۰۱۹؛ جیو و همکاران ۲۰۱۰). هیدروفوبیسیته در صنعت غذا نیز اهمیت دارد. به خصوص 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

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 لاکتوباسیل‌ها بر اساس طبقه‌بندی ارائه شده توسط آیاد و همکاران (۲۰۰۱) و دعوتی و همکاران (۱۳۹۶) از فعالیت اتولیتیکی نسبتاً 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 ۷۳-۹۴ درصد گزارش شدند، باکتری-هایی مانند لاکتوباسیلوس رامنسوس FAAU23 با فعالیت اتولیتیکی ۶۹-۴۰ درصد جزء گروه متوسط طبقه بندی شدند و باکتری‌هایی مانند لاکتوباسیلوس پلاننتاروم FAAU20 و لاکتوباسیلوس رامنسوس FAAU141 با فعالیت اتولیتیکی ۳۹-۴ درصد جزء گروه ضعیف طبقه بندی گردیدند.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد سوپرناتانت اسیدی فاقد سلول تاثیر ضد میکروبی بیشتری بر روی پاتوژن‌های 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 خصوصاً آنتی‌بیوتیک‌تراپی را کاهش داده است، جایگزین نمودن روش‌های جدید درمانی امری ضروری بنظر می‌رسد. امروز از باکتری‌های اسید لاکتیک جهت کاربردهای

مختلفی می‌تواند رخ دهد از قبیل: کاهش pH روده، رقابت با باکتری‌های پاتوژن در چسبیدن به گیرنده‌های سلول‌های اپی تلیال و رقابت بر سر مواد غذایی. خودتجمعی میان میکروارگانیزم‌ها به صورت دو تایی و کاملاً اختصاصی است و چسبیدن از طریق اتصال یک سلول با گیرنده پلی‌ساکاریدی سلول دیگر تکمیل می‌گردد (آ سلیم و همکاران ۲۰۰۷؛ امین نژاد و کسری-کرمانشاهی ۱۳۹۳). در پژوهشی که توسط امین نژاد 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 می‌گردد.

قابلیت تولید اسید لاکتیک یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های باکتری‌های اسید لاکتیک است که هم از نظر بعد تکنولوژیکی عطر و طعم خاصی به محصول فرآوری شده می‌دهد و هم از بعد ایمنی باعث جلوگیری از رشد باکترهای پاتوژن می‌گردد. دعوتی و زیبایی (۱۳۹۶) گزارش کردند تمامی سویه‌های اسید لاکتیک جدا شده از شیر شتر تک کوهانه ایرانی قابلیت کاهش ۰/۴ واحد pH در ۳ ساعت نخست تخمیر را دارا بودند. همچنین بیان داشتند سویه‌های لاکتوباسیلوس فرمنتوم، پدیوکوکوس پنتوزاسئوس و انتروکوکوس لاکتیس بیشترین قدرت تولید اسید بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسید لاکتیک را دارا بودند. میردامادی و همکاران (۱۳۸۶) تولید اسید لاکتیک توسط سویه‌های 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 رامنسوس با تولید ۸۱/۴ گرم بر لیتر لاکتات کلسیم و بازده ۶۳ درصد به عنوان بهترین باکتری‌های هموفرماتاتیو تولید کننده نوع ایزومر نوری (+) L اسید لاکتیک انتخاب شدند.

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، استالندئید، 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 لاکتوباسیلوس را علیه پاتوژن‌های بی‌هوازی دستگاه گوارش مورد مطالعه قرار داده و اثرات ضد میکروبی آن‌ها را تایید کردند.

فعالیت اتولیتیکی و مقاومت در برابر حرارت مورد بررسی 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 پلانتروم و پدیوکوکوس پنروزاسئوس بهترین عملکرد را از خود نشان دادند و می‌توان از آن‌ها جهت استفاده از سویه‌های مکمل در تولید محصولات غذایی استفاده نمود. پیشنهاد می‌شود آزمون‌های تکمیلی از قبیل توانایی چسبندگی به سلول‌های اپی تلیال روده، فعالیت ضد چسبندگی علیه پاتوژن‌های شاخص، فعالیت لیپولیتیک و پروتئولیتیک این سه سویه نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

#### نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق سویه‌های جدا شده از دوغ محلی شهرستان بهبهان ابتدا از نظر ویژگی‌های پروبیوتیکی از قبیل زنده‌مانی در دستگاه گوارش، هیدروفوبیسیته، خود و هم‌تجمعی مورد بررسی قرار گرفتند؛ سپس ویژگی‌های تکنولوژیکی آن‌ها از قبیل قابلیت تولید اسید،

#### 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 لاکتوباسیلوس کارژی در سووموناس آئروژینوزا، دومانه‌نامه فیض، ۱۸ (۱)، ۳۰-۳۷.
- دعوتی ن و زیبایی س. ۱۳۹۶. جدا سازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک دوغ شیر شتر تک کوهانه ایرانی و بررسی 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 ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و میکروبی ماست سویای سین بیوتیک، پژوهش‌های صنایع غذایی، ۳۰ (۳)، ۱۸۹-۲۰۱.
- میردامادی س، رجبی ا، عزیزمسنی ف و مومن ب. ۱۳۸۶. تولید اسید لاکتیک توسط سویه‌های مختلف لاکتوباسیل، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۲ (۳)، ۵۷-۶۴.
- نریمانی ط و تاری نژاد ع. ۱۳۹۳. جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌های پروبیوتیک از شیر و ماست سنتی گاو میش شهرستان خوی، ۲۴ (۳)، ۳۴۹-۳۳۵.

- 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 doświadczalna i Mikrobiologia* 53(2):133-142.

- 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.



*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<sup>1\*</sup>, B Alizadeh Behbahani<sup>1</sup> and M Hojjati<sup>1</sup>

Received: October 19, 2020

Accepted: December 8, 2020

<sup>1</sup>Assistant Professor, Assistant Professor and Professor respectively, 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  $\mu$ l of each bacterium was added to 270  $\mu$ l 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  $\mu$ l was mixed with 270  $\mu$ l 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 through 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

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. delbrueckii* 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