Food Research Journal

Online ISSN: 2676-5691 Print ISSN: 2008-515X
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

Isolation and identification of *Lactiplantibacillus plantarum* MOHA1 strain from local yogurt and evaluation of its probiotic, antibacterial, and safety properties

Behrooz Alizadeh Behbahani[1*]✉, Mohammad Hojjati[2] and Bahareh Goodarzi Shamsabadi[3]

[1]Associate Professor, [2]Professor and [3]PhD Student respectively, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
✉ Corresponding author: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

ARTICLE INFO

Article type:
Research Article

Article history:
Received: April 20, 2024
Accepted: July 4, 2024
Published: October 20, 2024

Keywords:
Probiotic, *Lactiplantibacillus plantarum*, Antioxidant, Hydrophobicity, Antimicrobial.

ABSTRACT

Background: This comprehensive laboratory study thoroughly investigated the probiotic and antimicrobial properties of the *lactiplantibacillus plantarum* MOHA1, a strain of great potential isolated from local yogurt.
Amis: The study aimed to evaluate the functional potential and antimicrobial activity of this strain, which, if it exhibited desirable characteristics, could be a game-changer for the production of dairy products as a supplementary culture or a natural preservative.
Methods: The strain was meticulously assessed for probiotic characteristics such as acid resistance (pH 2, 3, and 4), hydrophobicity, bile resistance (0.3%, 0.5%, and 0.7%), and cholesterol absorption. The production of biogenic amines, absence of hemolytic activity, and DNase activity were also examined. The antioxidant capacity of the isolated strain (DPPH and ABTS) was determined, and its antimicrobial properties (disk diffusion agar and well diffusion agar methods) were tested against six foodborne pathogenic bacteria (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Enterobacter aerogenes*). The potential for adhesion to Caco-2 cells, anti-adhesion, auto-aggregation, and co-aggregation were also determined.
Results: The highest reduction in the number of strains was observed after 3 hours at pH 2. With the decrease in pH from 4 to 2, a significant reduction in viable cell count was noted, decreasing from 7.7 to 6.20 Log CFU/mL. *Lpb. plantaru*m MOHA1 showed good resistance to all concentrations of bile salts. Hydrophobicity was 53.20%. The production of biogenic amines, DNase, and hemolytic activity were negative. Cholesterol absorption was 40.30%, DPPH radical scavenging activity was 45.80%, ABTS radical scavenging activity was 48%, auto-aggregation potential was 37.60%, and co-aggregation potential was 19.10%. The adhesion potential to Caco-2 cells was 11.30%, and the anti-adhesion potential against *E. coli* was 36.70% in competition, 35.50% in inhibition, and 22.40% in displacement.
Conclusion: Based on the results obtained, the strain has demonstrated acceptable probiotic and antimicrobial potential, instilling confidence in its future human use after further research.

Food Research Journal, 2024,34(4): 29-52
DOI: 10.22034/fr.2024.61987.1934

Extended Abstract

Introduction: Recent attention has been drawn to consuming probiotic-rich foods to enhance health and prevent diseases. Lactic acid bacteria are commonly used in fermenting foods due to their high potential to create aroma and flavor, inhibit pathogens, and prevent spoilage microorganisms. Probiotic strains commonly used belong to Lactobacillus and Bifidobacterium genera, both Gram-positive bacteria. Lactic acid bacteria are recognized for their significant presence in food items and potential use as protective cultures due to their specific attributes. These bacteria are part of the human gut microbiota, playing crucial roles in microbial balance and immune modulation (Alizadeh Behbahani et al., 2019; Alizadeh Behbahani et al., 2023; Alizadeh Behbahani et al., 2020; Fallah et al., 2021[a]; Fallah et al., 2021[b]). The primary requirement for developing a probiotic food product is selecting a suitable probiotic strain. Indigenous strains of lactic acid bacteria have gained particular importance in dairy industries due to their compatibility with regional conditions and ability to produce desirable flavors and aromas in fermented products. This research aims to evaluate the probiotic and antibacterial properties of *Lpb. plantarum* MOHA1 strain, including acid and bile tolerance, antibiotic resistance, cholesterol absorption, anti-adhesive properties, hydrophobicity, auto-aggregation, cell adhesion potential to Caco-2 cells, biogenic amine production, DNase activity, lack of hemolytic activity, and antioxidant activity. Additionally, the strain's antimicrobial efficacy against six foodborne pathogens (*Bacillus cereus, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, and Enterobacter aerogenes*) was assessed.

Materials and Methods: The research process was comprehensive and rigorous. Firstly, the *Lpb. plantarum* MOHA1 strain was isolated and identified using molecular methods. Subsequently, the strain was evaluated for a wide range of probiotic properties, including acid resistance (pH 2, 3, and 4), hydrophobicity, and bile resistance (0.3, 0.5, and 0.7). Cholesterol absorption was also assessed. Additionally, the strain underwent evaluation for biogenic amine production and hemolytic and DNase properties. The antioxidant property of the isolated strain (measured using DPPH and ABTS assays) was determined, and its antimicrobial activity against six foodborne pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*) was investigated using disc diffusion and agar well diffusion methods. Furthermore, adhesion potential to Caco-2 cells, anti-adhesion properties, auto-aggregation capacity, and co-aggregation of the strain were also evaluated.

Results and Discussion: The findings of this study have significant implications for the development of probiotic food products. One of the crucial criteria in evaluating the potential of probiotic strains is assessing their resistance to acidic conditions and high concentrations of bile salts. According to the World Health Organization, probiotics must be consumed sufficiently to demonstrate their beneficial effects. Conditions such as acidic pH can disrupt metabolism and reduce the growth and survival of lactic acid bacteria. The acids present in the human stomach degrade biological molecules such as fatty acids, proteins, vitamins, and nucleic acids. In this study, bile salt concentrations of 0.3%, 0.5%, and 0.7% (W/V) were tested to evaluate the resistance of the targeted strain. The results indicated that *Lpb. plantarum* MOHA1 has good resistance to different concentrations of bile salts. These findings are consistent with other studies that have shown lactobacilli can survive in high bile salt concentrations (Brezgár et al., 2021; Abushelaibi et al., 2017; Boricha et al., 2019; Molavi et al., 2019; Oulahal et al., 2018; Shahata et al., 2016). To assess the viability of *Lpb. plantarum* MOHA1, this bacterium was subjected to pH levels 3, 2, and 4. The results showed that the strain *Lpb. plantarum* MOHA1 has desirable viability under the examined conditions.

However, the highest strain viability reduction was observed after 3 hours at pH 2. With a decrease in pH from 4 to 2, a significant reduction in the number of viable cells was observed, decreasing from 7.7 to 2.6 Log CFU/mL. *Lactobacillus plantarum* converts sorbic acid into 1,3-pentadiene through decarboxylation and produces carbon dioxide and ethanol during fermentation. It can also metabolize sugar compounds and produce acidic compounds such as succinic acid, which lowers the pH level (Ghorbani et al., 2018).

Hydrophobicity is one of the important factors for bacteria regarding their adherence to various surfaces. Hydrophobicity depends on various factors such as van der Waals forces, Brownian motion, surface electric charge, and gravitational force. Therefore, this feature should be separately investigated for bacteria (Noshad et al., 2021). The hydrophobicity level of the *Lpb. plantarum* MOHA1 strain was determined to be 20.53% ± 0.60%. In a comprehensive study by Vosoughi et al. (2018), it was reported that *Lpb. plantarum* A44 isolated from whey exhibited the highest cellular hydrophobicity (84.5%) among other strains. In the study by Alizadeh Behbahani et al. (2019), the Hydrophobicity potential of the *Lpb. plantarum* L15 strain was found to be 54%. In the research conducted by Shahrampour et al. (2019), the effect of genetic diversity of *Lpb. Plantarum* strains isolated from different food sources were investigated for their antimicrobial, antioxidant, and cumulative activities. The results showed that the strain *Lpb. plantarum* KMC61 had the highest surface hydrophobicity percentage. However, there was a difference in surface hydrophobicity among the ten strains studied, which may be related to the biosynthesis and composition of their cell surface proteins and polysaccharides. The production of biogenic amines, DNase, and hemolytic activity were negative. In this study Cholesterol absorption was 40.30%. Many studies have shown that some lactic acid bacteria in cell culture media can reduce cholesterol concentration. In some studies, changes in the fatty acid pattern inside the cell have been observed following this reduction. In some cases, microscopic examination of the cell has shown deposition and binding of cholesterol to the bacterial surface. The presence of such strains as starter cultures in foods considered a source of cholesterol can be very beneficial (Modani et al., 2013). DPPH radical scavenging activity was 45.80%, and ABTS radical scavenging activity was 48%. The antimicrobial and antioxidant properties of *Lpb. plantarum* strains have been reported in various studies. Asadi et al. (2009) investigated the technological characteristics and antimicrobial activity of 17 strains of *Lpb. plantarum* isolated from a type of salted meat, and observed the highest inhibitory activity of *Lpb. plantarum* strains against *Staphylococcus aureus* bacteria. Auto-aggregation potential was 37.60%, and co-aggregation potential was 19.10%. The adhesion potential to Caco-2 cells was 11.30%. One of the most important criteria for selecting lactic acid bacteria as probiotics is their safety and tolerance to gastrointestinal conditions and their ability to adhere to the mucosal cells on the intestinal surface. Challenges associated with clinical studies on adhesion testing have led to the widespread use of simulated models at the laboratory scale. In particular, the use of the Caco-2 cell line for evaluating the adhesion of probiotic strains to the digestive system has gained significant attention because, under these conditions, the morphological and functional properties of cells on the surface of small intestinal villi are well-defined (Fallahi et al., 2018). Anti-adhesion potential against *E. coli* was 36.70% in competition, 35.50% in inhibition, and 22.40% in displacement. Pathogenic bacteria must attach to the intestinal cell wall to cause infection. Therefore, any factors that prevent this activity benefit health and intervene with the development of infection. Probiotic bacteria, through mechanisms such as producing antimicrobial compounds and disrupting or blocking molecules that pathogenic agents use for attachment, prevent the adhesion of pathogenic bacteria (Vosoughi et al., 2022). A study evaluating the probiotic potential of

indigenous Lactobacillus strains isolated from Zabol yellow cheese was conducted by Vosoughi et al. (2022). The antimicrobial effect of *Lpb. plantarum* MOHA1, both acidic and non-acidic, on pathogenic strains has been demonstrated using the agar diffusion and well methods Showed that the greatest inhibitory effect was observed against *L. monocytogenes*. This bacterium is a facultative anaerobe capable of surviving in both the presence and absence of oxygen and is known to cause a wide range of diseases in humans and animals. The least inhibition was observed in the agar diffusion method using disks against the pathogens *S. typhimurium* and *E. coli*, and in the agar diffusion method using wells against the pathogen *E. coli*. Intestinal Gram-negative bacteria such as *E. coli* and *S. typhimurium* are among the major causes of food poisoning and diarrhea.

Conclusion: Strains isolated from local fermented and dairy products are considered valuable sources of probiotics. These strains have high probiotic potential and exhibit significant antimicrobial properties. According to the results of this study, *Lpb. plantarum* MOHA1 can withstand acidic conditions in the stomach and the presence of bile salts, indicating essential traits for survival and effective performance in the human digestive system. This strain has demonstrated a high ability to inhibit pathogenic bacteria, attributed to the production of antimicrobial compounds that can inhibit the growth and proliferation of pathogens. Additionally, *Lpb. plantarum* MOHA1 is sensitive to common antibiotics, which can be beneficial in controlling infections and preventing microbial resistance. Other important characteristics of this strain include its ability to adhere to the intestinal wall, surface hydrophobicity, autoaggregation, and co-aggregation. These features enable this strain to adhere to the intestinal epithelial cells and form resilient colonies, which can improve digestive health and enhance the body's immune system. Given these properties, the *Lpb. plantarum* MOHA1 strain has a high potential for use as a probiotic supplement in fermentation cultures or as a co-culture in the production process of fermented food products. Using this strain can help improve food products' quality and shelf life and enhance consumer health. Further confirmatory tests and comprehensive research can strengthen these strains' practical and commercial applications in the food industry.

Keywords: Probiotic, *Lactiplantibacillus plantarum*, Antioxidant, Hydrophobicity, Antimicrobial.

پژوهش‌های صنایع غذایی
شاپا الکترونیکی: ۵۶۹۱-۲۶۷۶ ، شاپا چاپی ۵۱۵X- ۲۰۰۸
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

جداسازی و شناسایی سویه *Lactiplantibacillus plantarum* MOHA1 از ماست محلی و ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی، ضدباکتریایی و ایمنی آن

بهروز علیزاده بهبهانی[1*]، محمد حجتی[2]، بهاره گودرزی شمس‌آبادی[3]

به ترتیب [1]دانشیار، [2]استاد و [3]دانشجوی دکتری گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

مسئول مکاتبه: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

مشخصات مقاله | چکیده

نوع مقاله:
علمی پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۱۴۰۳/۲/۱
پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۱۴
انتشار: ۱۴۰۳/۷/۲۵

کلید واژگان:
پروبیوتیک، *Lactiplantibacillus plantarum*، آنتی‌اکسیدانی، هیدروفوبیسیتی، ضدمیکروبی.

چکیده

زمینه مطالعاتی: در این پژوهش آزمایشگاهی ویژگی‌های پروبیوتیکی، ضدباکتریایی و ایمنی سویه *Lactiplantibacillus plantarum* MOHA1 جداسازی شده از ماست محلی بررسی شد.

هدف: این مطالعه به منظور بررسی پتانسیل پروبیوتیکی و فعالیت ضدمیکروبی سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 جداسازی شده از ماست محلی انجام شد، تا در صورت دارا بودن ویژگی‌های عملکردی و ضدمیکروبی مطلوب، در تولید محصولات لبنی به‌عنوان کشت مکمل و یا به‌عنوان نگهدارنده طبیعی مورد استفاده قرار گیرد.

روش کار: ابتدا سویه، از نظر ویژگی‌های پروبیوتیکی از قبیل مقاومت به اسید (pH ۳،۲ و ٤)، خاصیت هیدروفوبیسیتی، مقاوت به صفرا (۰/۳، ۰/۵و ۰/۷) و جذب کلسترول مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس تولید آمین بیوژنیک، عدم فعالیت همولیتیک و DNase نیز بررسی شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سویه جداسازی شده (DPPH و ABTS) تعیین گردید و ویژگی ضدمیکروبی (روش دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار) سویه، در مقابل ٦ باکتری بیماری‌زای غذازاد بررسی شد. پتاسیل چسبندگی به سلول Caco-۲، ضدچسبندگی، تجمیع خودکار و انباشتگی نیز تعیین گردید.

نتایج: بیشترین میزان کاهش تعداد سویه مربوط به ماندگاری ۳ ساعت در pH برابر با ۲ بود. با کاهش pH از٤ به۲، کاهش قابل توجهی در تعداد سلول‌های زنده مشاهده شد و از ۷/۷ به ٦/۲۰ Log CFU/mL کاهش یافت. *Lpb. plantarum* MOHA1 درتمامی غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی مقاومت خوبی از خود نشان داد. خاصیت هیدروفوبی، ۵۳/۲۰ درصد بود. تولید آمین بیوژنیک، DNase، و فعالیت همولیتیک منفی بود. میزان جذب کلسترول ٤۰/۳۰، میزان مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS به ترتیب ٤۵/۸۰ و ٤۸ درصد بود. پتانسل تجمیع خودکار و انباشتگی به ترتیب ۳۷/٦۰ و ۱۹/۱۰ درصد به دست آمد. پتانسیل چسبندگی به سلول Caco-۲، ۱۱/۳۰ و پتانسیل ضدچسبندگی در برابر *E.coli* در رقابت ۳٦/۷۰، در مهار ۳۵/۵۰ و در جابه‌جایی ۲۲/٤۰ درصد به دست آمد.

نتیجه گیری نهایی: بر اساس نتایج به‌دست آمده، سویه دارای پتانسیل پروبیوتیکی و ضدمیکروبی قابل قبولی است و می‌تواند پس از پژوهش‌های بیشتر برای مصارف انسانی مورد استفاده قرار گیرد.

مقدمه

در سال‌های اخیر توجه دنیا به استفاده از غذاهای عملگرا حاوی باکتری‌های پروبیوتیک جهت ارتقای سلامت و پیشگیری از بیماری‌ها افزایش یافته است. با افزایش روند تقاضا در خصوص استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک در مواد غذایی، استفاده از این میکروارگانیسم‌های مفید به‌منظور افزایش ارزش تغذیه‌ای و درمانی آنها در صنعت غذا رشد چشمگیری یافته است (عبداللهی و تدینی، ۱٤۰۰). باکتری‌های اسید لاکتیک در تولید غذاهای تخمیری استفاده می‌شود که این امر به خاطر پتانسیل بالای این باکتری‌ها در ایجاد عطر و طعم، مهار پاتوژن‌ها و میکروارگانیسم‌های مولد فساد می‌باشد. سوش‌های باکتریایی رایجی که به‌عنوان پروبیوتیک به کار گرفته می‌شوند، اغلب متعلق به لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکترها هستند. لاکتوباسیل‌ها به شاخه فرمیکیوت و بیفیدوباکترها به شاخه اکتینوباکتر تعلق دارند. هر دو میکروارگانیسم گرم مثبت هستند با این تفاوت که درصد مولی G+C در بیفیدوباکتریوم‌ها (بیشتر از۶۰٪) از لاکتوباسیلوس‌ها (۳۹٪-۳۳٪) بیشتر است و مسیر کاتابولیستی بیفیدوباکترها از طریق شنت بیفیدیوم هگزوزی و آنزیم فروکتوز-٦-فسفوکتولاز انجام می‌شود (خالصی و همکاران ۲۰۱۸، زیبایی راد و همکاران ۲۰۲٤). باکتری‌های اسید لاکتیک معمولا 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 (نوشاد و همکاران ۱۳۹۹). این باکتری‌ها جزئی از فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان هستند که نقش مهمی در تعادل میکروبی و تعدیل سیستم ایمنی دارند (علیزاده بهبهانی و همکاران ۱۳۹۹، علیزاده بهبهانی و همکاران ۲۰۲۳، زیبایی راد و همکاران ۲۰۲۳، علیزاده بهبهانی و همکاران ۲۰۲۰، فلاح و همکاران، ۲۰۲۱[a]، فلاح و همکاران، ۲۰۲۱[b]). گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس برای تولید ترکیبات مختلف ضدمیکروبی علیه باکتری‌های شاخص عامل فساد شناسایی و مطالعه شده‌اند. این فعالیت ضدمیکروبی به‌صورت عمده به سنتز اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک و فنیل لاکتیک اسید مربوط می‌شود (علیزاده بهبهانی و همکاران ۱۳۹۹). پروبیوتیک‌ها، در صورت افزوده شدن به مواد غذایی و یا مصرف آن‌ها به شکل مکمل، می‌توانند با ایجاد یک تعادل بیولوژیک در بدن، موجب بهبود سلامت (تکلو و همکاران ۱۳۹۵ و مورمن و استاموتاوا،۲۰۰۷) و ایجاد تاثیرات مفیدی هم‌چون کاهش عفونت‌های گوارشی، کاهش اسهال‌های مزمن و مسافرتی، داشتن فعالیت تخمیری، رشد و ماندگاری مناسب در محصولات غذایی، مقاومت در برابر فاژها، تنظیم فلور نرمال حفره‌های دهانی و روده و مهار باکتری‌های بیماری‌زا و مضر شوند (وندرپل و همکاران ۲۰۰۸). تولید ترکیبات شبه باکتریوسینی یا پپتیدهای ضدمیکروبی یکی دیگر از دلایل پتانسیل ضدمیکروبی باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس بیان شده است. فعالیت آنتاگونیستی برخی باکتری‌های اسید لاکتیک و همچنین تولید متابولیت‌های خاص از قبیل پپتیدهای زیست‌فعال به‌صورت خارج سلولی چشم اندازهای مفیدی برای نگهداری و افزایش ماندگاری مواد غذایی فراهم کرده است (رودریگز و همکاران ۲۰۱۳). نخستین ضرورت برای توسعه یک فرآورده غذایی پروبیوتیکی انتخاب سویه پروبیوتیکی مناسب است. سویه‌های بومی باکتری‌های اسیدلاکتیک اهمیت ویژه‌ای در صنایع لبنی یافته‌اند، چرا که این سویه‌ها علاوه بر آنکه دارای ویژگی‌های سازگاری با شرایط همان منطقه می‌باشد، از توانایی خاص در تولید طعم و بوی مطلوب در تهیه انواع فرآورده‌های تخمیری، برخوردار هستند. با توجه به اینکه بروز خصوصیات پروبیوتیکی کاملاً وابسته به جنس و سویه است؛ هدف از پژوهش حاضر ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی، ضدباکتریایی و ایمنی سویه ***Lpb. plantarum*** MOHA1 است. تحمل اسید و صفرا از جمله معیارهای اصلی ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی محسوب می‌شود که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. همچنین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، جذب کلسترول، خاصیت ضدچسبندگی، هیدروفوبیسیتی، ظرفیت تجمع خودکار و انباشتگی سلول، پتانسیل چسبندگی به سلول Caco-۲ تولید آمین بیوژنیک، فعالیت DNase ، عدم فعالیت همولیتیک و ارزیابی فعایت آنتی‌اکسیدانی در این پژوهش نیز مورد مطالعه

قرار گرفته است. علاوه بر این ویژگی ضدمیکروبی (روش دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار) سویه، در مقابل ٦ باکتری بیماری‌زای غذازاد (*Bacillus cereus*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Listeria monocytogenes*، *Salmonella typhimurium* و *Enterobacter aerogenes*) بررسی شد.

مواد و روش ها

جداسازی و شناسایی سویه به روش ملکولی

این پژوهش آزمایشگاهی در سال ۱٤۰۲ در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. ابتدا ۵ گرم از نمونه ماست محلی جمع آوری شده به ٤۵ میلی‌لیتر پپتون واتر (۰/۱ درصد) اضافه و نمونه‌ها هوموژن شدند. پس از آماده‌سازی رقت‌ها کشت میکروبی بر محیط کشت MRS آگار انجام شد و ظروف میکروبی در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. باکتری از محیط کشت جدا شد و آزمون‌های مبتنی بر کشت همانند رنگ‌آمیزی گرم و کاتالاز روی آن انجام شد. سپس، DNA ژنومی با استفاده از کیت Genomic DNA isolation VI استخراج شده و در محیط کشت MRS براث به مدت ۲٤ ساعت کشت داده شد. از پرایمرهای عمومی که بر اساس نواحی حفظ شده 16S rRNA طراحی شده‌اند، استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز در کیت PCR انجام شد. میکروتیوب حاوی PCR درون دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت و برنامه دمایی آن مطابق با پژوهش‌های سبکتکین و همکاران (۲۰۲۰) و وسیعی و همکاران (۲۰۱۸)، تنظیم گردید. در نهایت مشخص گردید باکتری با ویژگی‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی با میزان تشابه ۹۹ درصدی سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 است.

آزمون مقاومت به اسید

جهت بررسی آزمون مقاومت به اسید، سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط بی‌هوازی کشت داده شد. باکتری‌های رشد یافته به مدت ۱۰ دقیقه در در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (٦۰۰۰g) شدند. با استفاده از محلول نمک فسفات بافری (سیگما – آلدریچ) رسوب ایجاد شده دو بار شست و شو داده شد و مایع رویی دور ریخته شد. سوپانسیون میکروبی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ٦۲۰ نانومتر به جذب نوری ۰/٦ رسید. ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به درون میکروتیوب حاوی ٤۵۰ میکرولیتر محلول نمک فسفات بافری (PBS) ریخته شده که به عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته خواهد شد. نمونه کنترل به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه‌گذاری گردید (برزگر و همکاران، ۲۰۲۱). از HCl (۰/۱ نرمال)، توسط محلول نمک فسفات بافری (PBS)، اسیدهایی با pHهای ۲، ۳ و ٤ تهیه شد. در میکروتیوب‌های حاوی ٤۵۰ میکرولیتر PBS استریل با pHهای مورد نظر میزان ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی ریخته شد و همراه با نمونه کنترل انکوبه‌گذاری شد. پس از گذشت ۳ ساعت، برای نمونه ها تا 10^{-9} رقت‌سازی انجام شد. در انتها از رقت‌های مورد نظر به میزان ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون در پلیت‌های حاوی MRS آگار کشت خطی داده شد و بعد از ۲٤ ساعت در جار بی‌هوازی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه‌گذاری شد و تعداد باکتری *Lpb. plantarum* MOHA1 رشد یافته شمارش شد.

آزمون نمک‌های صفراوی

به منظور ارزیابی مقاومت به صفرا، *Lpb. plantarum* MOHA1 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. بعد از فعال‌سازی *Lpb. plantarum* MOHA1، عمل سانتریفوژ با دور ۹۰۰۰g به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 بر محیط‌های MRS آگار حاوی غلظت‌های ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ درصد از نمک صفراوی کشت داده شد. در نهایت گرمخانه‌گذاری تحت شرایط بی‌هوازی به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. ضمنا از سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 کشت داده شده بر محیط MRS آگار

که فاقد نمک صفراوی بود به عنوان نمونه کنترل استفاده شد (مومن‌زاده و همکاران ۱٤۰۰).

هیدروفوبیستی سطح سلول

هیدروفوبیستی سطحی به عنوان شاخصی از تمایل باکتری‌ها جهت اتصال به حلال‌های غیرقطبی مطرح می‌شود. در حقیقت، هیدروفوبیستی بالا، این پتانسیل را به آن‌ها می‌دهد که از محیط آبی به محیط آلی یا غیر قطبی نقل مکان کرده و باکتری را قادر می‌سازد به ذرات هیدروکربنی روی سلول یا سطوح مخاطی بچسبد (نوشاد و همکاران ۱٤۰۰). پس از فعال‌سازی سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 عمل سانتریفوژ به مدت ۱۲ دقیقه در دور ٦۰۰۰rpm انجام شد. شست و شو با استفاده از محلول نمک فسفات بافری استریل انجام و جذب سوسپانسیون در طول موج ٦۰۰ نانومتر بر ۰/٦ تنظیم شد(A_1). ٤ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 با ۲ میلی‌لیتر n –هگزادکان مخلوط و عمل ورتکس کردن به مدت دو دقیقه انجام شد. در نهایت جهت انتقال باکتری بین دو فاز مخلوط حاصل شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای محیط) به مدت ٦۰ دقیقه قرار گرفت و سپس جذب محلول آبی در طول موج ٦۰۰ نانومتر خوانده شد(A_2) . هیدروفوبیستی با رابطه زیر محاسبه شد (نوشاد و همکاران ۱٤۰۰).

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

تولید آمین بیوژنیک

کنترل تجمع آمین‌ها در فرآورده‌های تخمیری که بخش اعظم آمین‌های بیوژن در موادغذایی را هیستامین تشکیل می‌دهد یکی از چالش‌های حاضر در صنعت غذا می‌باشد . توانایی سویه‌های لاکتوباسیلوس برای تولید آمین بیوژنیک بر اساس پژوهش برزگر و همکاران (۲۰۲۱)، انجام شد. سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 در محیط کشت MRS مایع حاوی ۰/۱ درصد از هر اسید آمینه پیش ساز و ۰/۰۰۵ درصد پیریدوکسال ۵–فسفات کشت داده شد. سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 بر MRS آگارهای با و بدون اسیدهای آمینه که حاوی ۰/۰٦ بروموکرزول بنفش (سیگما – آلدریچ) بودند کشت داده شدند (عمل گرمخانه‌گذاری ۲ تا ۵ روز). رنگ بنفش مشاهده شده در اطراف کلنی‌ها به عنوان تست مثبت در نظر گرفته شد.

تست دئوکسی ریبونوکلئاز

آزمون دئوکسی ریبونوکلئاز مطابق با روش وسیعی و همکاران (۲۰۲۰)، انجام شد. سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 بر محیط کشت DNase آگار به صورت خطی کشت داده شد. بعد از ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی تولید آنزیم انجام شد. چناچه ناحیه شفاف و صورتی رنگ در اطراف کلونی مشاهده شود به عنوان DNase مثبت گزارش شد.

فعالیت همولیتیک

آزمون عدم فعالیت همولیتیک، در بررسی عدم تجزیه‌کنندگی خون و در نتیجه عدم بیماری‌زایی توسط سویه جداسازی شده می‌باشد. آزمون فعالیت همولیتیک مطابق با روش وسیعی و همکاران (۲۰۲۰)، انجام شد. کشت خطی سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 بر محیط کشت تریپتیک سوی آگار (مرک آلمان) با ۷ درصد (v/v) خون گوسفند انجام گردید. ظروف میکروبی به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت، مطابق با مطالعه وسیعی و همکاران (۲۰۲۰)، تفسیر نتایج انجام شد. از باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. (وسیعی و همکاران ۲۰۲۰).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط مهار رادیکال DPPH[1] و ABTS[2] و جذب کلسترول

یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 (معادل 10^9 CFU/mL) در آب مقطر استریل، به ۲ میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (۰/۰۵ میلی‌مولار) اضافه گردید. ۰/۱ میلی‌لیتر از روماند فیلتر شده به

[1] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

[2] 2,2-azinobis ethylbenzothiazline-6-sulfonic acid

۳/۹ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۱ میلی‌مولار DPPH اضافه شده و پس از مخلوط نمودن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک نگهداری شد. در نهایت جذب هر یک از محلول‌ها پس از عمل سانتریفوژ کردن در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد (شهرام پور و همکاران ۱۳۹۷).

برای تعیین مهار رادیکال آزاد ABTS، ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه و ۶۰۰ میکرولیتر از محلول ABTS مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. میزان جذب در طول موج ۷۳٤ نانومتر اندازه‌گیری شد (علیزاده بهبهانی و همکاران ۲۰۲۳). فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد} = (1-\frac{A_{\text{نمونه}}}{A_{\text{کنترل}}})\times 100$$

تعیین میزان جذب کلسترول مطابق با مطالعه علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۳)، انجام شد.

آزمون مقامت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی

برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک در برابر یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاوم هستند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی ممکن است به‌طور طبیعی اتفاق بیفتد یا توسط مکانیسم‌های ژنتیکی مانند انتقال ژن از طریق پلاسمیدها حاصل شود. به منظور بررسی حساسیت *Lpb. plantarum* MOHA1 به آنتی‌بیوتیک، ابتدا از کشت جامد ۲٤ ساعت میکروارگانیسم، سوسپانسیونی معادل استاندارد نیم‌مک فارلند تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از آن روی محیط MRS آگار کشت سطحی داده شد. بعد از این مرحله دیسک‌های آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰(µg/mL، کلرامفنیکل (۳۰(µg/mL، پنیسیلین (µg/mL) ۱۰، ونکومایسین (µg/mL) ۳۰، نیتروفورازون (µg/mL) ۳۰۰، نالیدیکسیک (µg/mL) ۳۰، ایمیپنیم (µg/mL) ۱۰و سیپروفلوکساسین (µg/mL) ۵، روی محیط کشت قرار داده شد. ظروف میکروبی در شرایط بی‌هوازی به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. قطر هاله عدم رشد مشاهده شده در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک رایج درمانی به طور دقیق با خط‌کش اندازه‌گیری شد و بر حسب میلی‌متر گزارش گردید (نوشاد و همکاران ۱٤۰۰).

بررسی فعالیت ضدمیکروبی سویه *Lpb. plantarum* MOHA1

جهت بررسی فعالیت ضدباکتریایی سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 از روش نفوذ در چاهک[1] و دیسک دیفیوژن[2] استفاده شد. سویه‌های بیماری‌زای غذازاد مورد استفاده در این آزمون شامل: *Bacillus cereus*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Listeria monocytogenes*، *Salmonella typhimurium* و *Enterobacter aerogenes* بود. برای تهیه روماند، سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 در ۱۰ میلی‌لیتر محیط MRS مایع تلقیح و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شد. سپس کشت فعال آن تحت سانتریفوژ (g ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) قرار گرفت. برای اطمینان از حذف کامل سلول‌های باکتریایی روماند حاصل از فیلتر سرنگی با قطر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. تا زمان انجام آزمون روماند بدست آمده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد (شهرام‌پور و همکاران ۲۰۱۸).

۵۰ میکرولیتر از کشت فعال باکتری‌های شاخص بیماری زای غذازاد مطابق با استاندارد نیم مک‌فارلند (۱/۵×۱۰^{۸} CFU/mL) در سطح پتری دیش‌ها حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار که قبلا درون آن‌ها چاهک‌هایی به قطر ٦ میلی‌متر تعبیه شده بود پخش شد. روماند سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 به درون چاهک‌ها ریخته شد. بعد از عمل پیش انتشار یک ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در نهایت بعد از گذشت ۲٤ ساعت از انکوبه کردن هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف چاهک‌ها با خط‌کش اندازه‌گیری شده و بر حسب میلی‌متر نتایج ثبت شد. اصول کلی روش دیسک دیفیوژن آگار نیز مطابق با چاهک آگار بوده با این تفاوت که از دیسک‌های کاغذی استریل (پادتن طب، ایران) به جای چاهک جهت ارزیابی خواص ضدمیکروبی روماند سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 در برابر

[1]Agar well diffusion method

[2]Disk diffusion test

باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد استفاده می‌شود (علیزاده بهبهانی و همکاران ۲۰۲۳).

ظرفیت تجمع خودکارو انباشتگی سلول

این آزمون مطابق با روش وسیعی و همکاران (۲۰۲۰)، انجام شد. به طور خلاصه، برای ارزیابی این ویژگی بعد از تهیه کشت ۲٤ ساعته از سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 عمل سانتریفیوژ کردن به مدت ۱۰ دقیقه در دور ٦۰۰۰rpm انجام شده و عمل شست و شو کردن تا رسیدن به جذب ۰/٦ در طول موج ٦۰۰ انجام شد (A_0). بعد از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد نمونه به دست آمده در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) دانسیته نوری سوسپانسیون میکروبی اندازه‌گیری شد (A_1). ظرفیت تجمع خودکار با استفاده از فرمول زیر به‌دست آمد:

$$\%\text{Auto-aggregation} = \left[\frac{A_0-A_1}{A_0}\right]\times 100$$

برای محاسبه میزان انباشتگی ابتدا مقادیر مساوی از سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 و *E. coli* مخلوط و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شدند. بعد از عمل مخلوط کردن، سوسپانسیون به مدت ۳ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای محیط) قرار گرفت. در طول موج ٦۰۰ نانومتر مقدار جذب این مخلوط و هر سوسپانسیون به صورت جداگانه اندازه‌گیری شد. میزان انباشتگی نیز با معادله زیر محاسبه گرید:

$$\%\text{Co-aggregation} = \left[1-\frac{A_m}{\frac{A_p+A_s}{2}}\right]\times 100$$

در این فرمول A_m میزان جذب سوسپانسیون مخلوط را بعد از ۳ ساعت نشان می دهد و A_p و A_s نشان دهنده جذب *Lpb. plantarum* MOHA1 و *E. coli* می‌باشد.

پتانسیل چسبندگی به سلول caco-۲

جهت ارزیابی ظرفیت چسبندگی سویه، سلول‌های Caco-۲ در محیط کشت DMEM[1] (حاوی ۱ درصد پنی سیلین استرپتومایسین و ۱۰ درصد FBS[2] غیرفعال شده با حرارت) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط محیطی ۵ به ۹۵ درصد از CO_2 و رطوبت ثابت، نگهداری شدند. سلول‌های Caco-۲ در پلیت‌های ٦ خانه کشت داده شدند. به مدت ۱۵ روز رشد سلول‌ها ادامه پیدا کرده و محیط کشت هر ۲ روز یکبار عوض گردید. در کف پلیت یک لایه نازک از سلول تشکیل شد. سویه فعال شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانترفیوژ شد و دانسیته آن OD=۱ رسانده شد. تعداد باکتری نیز در محیط کشت MRS آگار شمارش شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون را به سلول Caco-۲ که از قبل با بافر فسفات شست و شو شده و از حذف آنتی‌بیوتیک مطمئن شدیم، اضافه نموده، به طوری که نسبت Caco- ۲ به باکتری بیش از ۱ به ۱۰۰ شد. انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 به مدت ۱ ساعت انجام شد. در نهایت ۳ مرتبه شست و شو با بافر فسفات به منظور حذف سلول‌های اتصال نیافته، انجام گردید. برای جداسازی باکتری‌ها از سلول، ۱ میلی‌لیتر تریتون X100 به چاهک اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. توانایی چسبندگی باکتری براساس تعداد باکتری‌های چسبیده نسبت به تعداد کل باکتری اولیه گزارش شد (فلاح و همکاران ۱۳۹۸).

$$\text{Adhesion} = \frac{\text{Adhered bacteria}}{\text{Total number of bacteria in the wells}}$$

خاصیت ضد چسبندگی سلول

به منظور ارزیابی رقابت[3]، بازداری[4] و جایگزینی[5] باکتری *E. coli*، مقادیر مساوی از باکتری‌ها به چاهک‌ها اضافه شدند و به مدت ۱ ساعت در شرایط محیطی ۵ به ۹۵ در صد از CO_2 و رطوبت ثابت، گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. از بافر فسفات استریل برای شستشوی باکتری‌های آزاد و۰/۰۵ درصد از تریتون۱۰۰-X برای جدا کردن باکتری‌های چسبیده استفاده شد. برای تشخیص بیماری‌زا، از محیط انتخابی استفاده شد و رقابت بین دو گونه برای

[1]Dulbecco's modified Eagle's medium
[2] Fetal bovine serum
[3]Competition
[4]Inhibition
[5] Displacement

چسبندگی سلول‌های Caco-۲ با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (کردونی و همکاران ۲۰۲۳).

$$\text{Competition}=\left(\frac{\text{Adhered } \textit{E. coli} \text{ with } \textit{Lpb. plantarum} \text{ MOHA1}}{\text{Bounded } \textit{E. coli} \text{ with } \textit{Lpb. plantarum} \text{ MOHA1}}\right)\times 100$$

سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 به چاهک حاوی سلول‌های Caco-۲ منتقل شده و عمل گرمخانه‌گذاری به مدت ۱ ساعت تحت فشار CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام گردید. برای حذف باکتری‌های آزاد و *E. coli* شستشو با بافر استات استفاده شد و سپس به چاهک اضافه شدند. سپس به مدت ۱ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و حذف *E. coli* با جدا کردن سلول‌های Caco-۲ و گونه‌های باکتری با تریتون X-۱۰۰ انجام شد. شمارش باکتری‌ها انجام شد و اثر مهاری به صورت زیر محاسبه شد.

$$\text{Inhibition}=\left(1-\frac{\textit{E. coli} \text{ Adhesion in the presence of } \textit{Lpb. plantarum} \text{ MOHA1}}{\textit{E. coli} \text{ Adhesion in the abcence of } \textit{Lpb. plantarum} \text{ MOHA1}}\right)\times 100$$

سنجش جایگزینی به منظور ارزیابی جایگزینی *Lpb. plantarum* MOHA1 با سویه بیماری‌زا سلول‌های روده ای انجام می‌شود. مراحل آزمایش مجددا تکرار می‌شود با این تفاوت که ابتدا باکتری *E. coli* و سپس *Lpb. plantarum* MOHA1 پس از انکوباسیون (۱ساعت) اضافه شد. درصد جابجایی با مقایسه *E. coli* چسبیده با آن‌هایی که *Lpb. plantarum* MOHA1 نداشتند، محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

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

نتایج و بحث

مقاومت به اسید

از معیارهای مهم در بررسی پتانسیل سویه‌های پروبیوتیکی، بررسی مقاومت آن‌ها نسبت به شرایط اسیدی و غلظت بالای نمک‌های صفراوی است. مطابق تعریف سازمان جهانی بهداشت، پروبیوتیک‌ها باید به مقدار کافی مصرف شوند تا اثرات مفید خود را نشان دهند. شرایطی مانند pH اسیدی محیط می‌تواند متابولیسم را مختل کرده و رشد و بقای باکتری‌های اسید لاکتیک را کاهش دهد. اسیدهای موجود در معده انسان مولکول‌های زیستی مانند اسیدهای چرب، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و اسیدهای نوکلئیک را تخریب می‌کنند. سلول‌های معده روزانه حدود ۲ لیتر شیره معده اسیدی ترشح می‌کنند که شرایط سختی را برای بقای میکروارگانیسم‌هایی که از معده عبور می‌کنند، ایجاد می‌کند (صبوری و همکاران ۲۰۲۳).

نتایج ارزیابی مقاومت سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 نسبت به شرایط اسیدی در شکل ۱، نشان داده شده است. به منظور بررسی زنده‌مانی *Lpb. plantarum* MOHA1، این باکتری طی pHهای۲، ۳ و ٤ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 ماندگاری مطلوبی در شرایط مورد بررسی دارد. با این حال بیشترین میزان کاهش سویه مربوط به ماندگاری ۳ ساعت در pH ۲ می‌باشد. با کاهش pH ٤ به ۲، کاهش قابل توجهی در تعداد سلول‌های زنده مشاهده شد و از ۷/۷ به ٦/۲ Log CFU/mL کاهش یافت. *Lpb. plantarum* با دکربوکسیله کردن اسید سوربیک منجر به تبدیل آن به ۱ و۳ –پنتادیان و همچنین تولید دی‌اکسیدکربن و اتانول طی فرآیند تخمیر می‌گردد. همچنین قادر به متابولیزه کردن ترکیبات قندی و تولید ترکیبات اسیدی مانند سوکسینیک اسید می‌باشد که باعث کاهش میزان pH گردیده است (قربانی و همکاران ۱۳۹۷).

در تحقیق یون و همکاران (۲۰۰۸)، سویه‌های *Lactobacillus acidophilus*، *Lpb. plantarum*، *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus delbrueckii* برای تولید آب گوجه پروبیوتیک استفاده شدند. نتایج نشان داد *Lpb. plantarum* نسبت به سایرگونه‌ها، قند را با سرعت بیشتری مصرف و در نتیجه اسید بیشتری در آب گوجه فرنگی تولید شده و در نهایت موجب کاهش قابل توجه pH گردید.

دینگ و شاه (۲۰۰۷)، اثر pH۲/۵ ≤ را بر کاهش ۸ گونه مختلف لاکتوباسیلوس بررسی کردند. یافته‌ها نشان داد که سلول‌های باکتری به شدت به pH پایین حساس هستند. در مطالعه دیگری، پارنته و همکاران (۲۰۱۰)، فعالیت دو آنزیم، آرژینین دآمیناز و گلوتامات دکربوکسیلاز را در *Lpb. plantarum* در مواجهه با غلظت‌های مختلف اسید بررسی کردند. آن‌ها دریافتند که سطح فعالیت دو آنزیم با افزایش غلظت اسید افزایش می‌یابد؛ اما این افزایش در سطح فعالیت در pH۳ روند نزولی داشت. F1F0-ATPase یکی از مکانیسم‌های اصلی برای حفاظت از میکروارگانیسم‌های گرم‌مثبت در برابر شرایط اسیدی است. عوامل دیگری مانند ترکیب محیط رشد، ترکیب غشای سلولی، ترکیبات غذایی و نوع میکروارگانیسم می‌توانند بر مقاومت به pH تأثیر بگذارند (باسکا و همکاران ۲۰۱۶). در پژوهش نوشاد و همکاران (۱۴۰۰)، ویژگیهای پروبیوتیکی و تکنولوژیکی باکتریهای اسید لاکتیک جدا شده از دوغ محلی بهبهان ارزیابی شد. در این مطالعه مقاومترین سویه نسبت به pH ۲/۵ و ۳/۵ باکتری‌های *Lpb. plantarum*، *Lactobacillus delbrueckii* و *Pediococcus pentosaceus* بودند. در مطالعه عیسوند حیدری و همکاران(۱۳۹۸)، نتایج نشان داد که باکتری *Lpb. plantarum* LZ95 در pHهای ۳/۵ و ۵ به‌ترتیب ۳۵/۸۵ و ۹۶/۶۹ درصد قابلیت زنده‌مانی داشت.

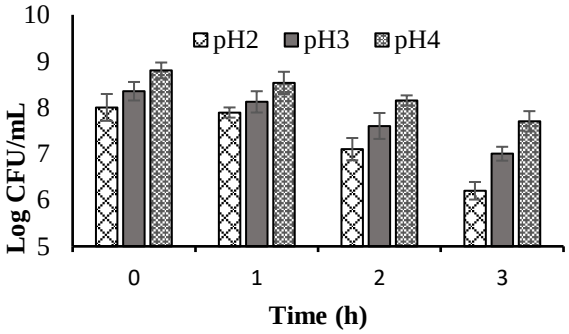

Fig 1- The capacity *Lactiplantibacillus plantarum* MOHA1 to endure in an acidic pH environment.

مقاومت به غلظت‌های مختلف نمک صفراوی

نتایج بررسی مقاومت به نمک صفراوی در جدول ۱، آورده شده است. در این پژوهش غلظت‌های (۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ W/V)، نمک‌های صفراوی برای بررسی مقاومت سویه مورد نظر مورد آزمون قرار گرفت. نتایج نشان داد که *Lpb. plantarum* MOHA1 در غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی مقاومت خوبی دارد. در پژوهش‌های مختلفی گزارش شده است که لاکتوباسیلوس‌ها می تواند در غلظت‌های مختلف صفراوی خود را حفظ کرده و رشد نمایند که از آن می‌توان به مطالعه‌های برزگر و همکاران ۲۰۲۱، ابوشلاییبی و همکاران، ۲۰۱۷؛ بوریچا و همکاران، ۲۰۱۹؛ مولاو و همکاران، ۲۰۱۹؛ اولاتوند و همکاران، ۲۰۱۸؛ شهاتا و همکاران، ۲۰۱۶ اشاره نمود. نتایج این پژوهشگران با مطاالعه حاضر همخوانی داشت. صفرا یک ترشح گوارشی است که قطرات بزرگ چربی را به قطرات کوچکتر تجزیه می‌کند، باعث امولسیون و در نهایت هضم مولکول‌های چربی می‌شود. تمام باکتری‌ها، دیواره سلولی حاوی اسیدهای چرب دارند که می‌تواند توسط نمک‌های صفراوی تخریب شود (اکودو و همکاران ۲۰۲۲). ایزوله‌هایی که به غلظت‌های بالای نمک‌های صفراوی مقاوم هستند، می‌توانند در غلظت طبیعی صفرا در دستگاه گوارش انسان زنده بمانند و رشد کنند. ترشح نمک‌های صفراوی به دوازدهه به‌طور مستقیم رشد باکتری‌های پروبیوتیک را مختل می‌کند. خواص دترجنتی نمک‌های صفراوی به آن‌ها امکان نفوذ به غشاهای سلولی باکتری‌ها را داده و ساختار آن‌ها را مختل و هموستازی سلولی را تغییر می‌دهند (منتزورانی و همکاران ۲۰۱۹). در پژوهش عیسوند حیدری و همکاران (۱۳۹۸)، باکتری *Lpb. plantarum* LZ95 در تمامی غلظتهای نمک صفراوی مورد آزمایش قادر به رشد بود. در مطالعه صبوری و همکاران (۲۰۲۳)، صفرا گاوی مورد استفاده حاوی املاح صفراوی کونژوگه و غیر کونژوگه مانند اسید تائوروکولیک، اسید گلیکولیک (اسید هیدروکسی استیک)، لکتین و کلسترول بود. در بین ایزوله‌های مورد بررسی، *Lpb. plantarum* PM411 و *P. pentosaceus* H11 نسبت به املاح صفراوی کونژوگه مقاوم بودند

Table 1- The effect of different concentrations of bile salt on the viability of *Lactiplantibacillus plantarum* MOHA1

	0.3%	0.5%	0.7%	Control
Survivability	Growth	Growth	Growth	Growth

هیدروفوبیسیتی سطح سلول

هیدروفوبیسیتی یکی از فاکتورهای مهم برای باکتری‌ها جهت چسبندگی به سطوح مختلف است. هیدروفوبیسیتی به فاکتورهای متعددی از قبیل نیروی واندروالس، حرکت براونی، بار الکتریکی سطح و نیروی گرانشی بستگی دارد. لذا در مورد باکتری‌ها باید به صورت مجزا این ویژگی بررسی گردد (نوشاد و همکاران ۲۰۲۱). مطابق مطالعه خانقلی و همکاران (۲۰۱۶)، ساختار و ماهیت گروه‌های شیمیایی روی سطح سلول‌های باکتری که خواص فیزیکوشیمیایی سلول‌ها را تعیین می‌نماید، ثابت نیست و به عوامل مختلف فیزیکی و شیمیایی که سلول را احاطه کرده بستگی دارد. با توجه به پژوهش‌های انجام شده در زمینه شیمی سلول‌های باکتریایی به طور کلی آبگریزی سطحی سلول به حضور ترکیبات پروتئینی و ویژگی‌های هیدروفیل سطح به حضور پلی‌ساکاریدها مربوط می‌شود. هیدروفوبیسیتی توسط اجزای آبگریز مواد در غشای خارجی باکتری‌ها ایجاد می‌شود. همچنین

آبگریزی به عنوان اثر متقابل هیدروفوبیسی شناخته می‌شود که نقش مهمی در چسبندگی باکتری‌ها به سلول‌های اپیتیال دارد. میزان هیدروفوبیسیتی در سویه *Lpb. plantarum* MOHA1، ۰/۶۰±۵۳/۲۰ درصد به دست آمد. در مطالعه وسیعی و همکاران (۲۰۱۸)، گزارش شد که *Lpb. plantarum* A44 جداسازی شده از حره بیشترین هیدروفوبیسیتی سلولی را (۸٤/۵ درصد) در بین سویه‌های دیگر نشان داد. در مطالعه علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۹)، پتانسیل آبگریزی سویه *Lpb. plantarum* ٥٤ درصد به دست آمد. در و مطالعه شهرام‌پور و همکاران (۱۳۹۸)، اثر تنوع نژادی سویه‌های *Lpb. plantarum* جدا شده از موادغذایی مختلف را بر فعالیت ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و تجمعی آن‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد بالاترین درصد آبگریزی سطحی را سویه *Lpb. plantarum* KMC61 دارا بود، اما بین آبگریزی سطحی ۱۰ نژاد مورد بررسی تفاوت که احتمالا به بیوسنتز و آرایش مشابه ترکیبات پروتئینی و پلی‌ساکاریدی سطح سلول آنها ارتباط دارد. همچنین سویه‌های مورد بررسی در مطالعه مذکور نسبت به سویه‌های *Lpb. plantarum* در مطالعه ان جی و همکاران (۲۰۱۵)، از قابلیت آبگریزی سطحی بیشتری برخوردار بودند. درجه آب‌گریزی بین میکروارگانیسم‌ها و سویه‌های مختلف متفاوت است و تحت تأثیر سن و بار شیمیایی سطح باکتری قرار می‌گیرد.چسبیدن، کلون سازی و تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها به شدت با آب گریزی سطح سلول آنها مرتبط است (روحی و همکاران ۲۰۲٤).

ظرفیت تجمع خودکار، انباشتگی سلول و پتانسیل چسبندگی به سلول

از جمله مهمترین معیارهای انتخاب باکتری‌های اسیدلاکتیک به عنوان پروبیوتیک علاه بر ایمن بودن و تحمل شرایط گوارشی، توانایی اتصال به سلول‌های مخاطی در سطح روده است. توانایی اتصال سلول باکتری به موکوس روده تحت عنوان چسبندگی نامیده می‌شود. در صورت آسیب دیدن به بافت اپیتلیال، احتمال چسبندگی سلول باکتری کمترمی‌شود. در واقع پروبیوتیک‌ها با مهار جایگاه‌های اتصال باکتریایی بر سطوح سلول‌های اپیتیال روده در محافظت از میزبان نقش مهمی دارند چرا که از اتصال و استقرار باکتری‌های بیماری‌زا که جهت ایجاد بیماری باید به سلول‌های روده متصل شوند، ممانعت می‌نمایند. ویژگی خوداتصالی یک عامل مؤثر در افزایش میزان اتصال باکتری های اسیدلاکتیک به یکدیگر به منظور لانه‌گزینی در سطح سلول‌های اپیتیال روده می‌باشد. در حالیکه قابلیت تجمعی، یک عامل مؤثر در جلوگیری از تجمع و لانه‌گزینی باکتری‌های بیماری‌زا است و نهایتا هر دو ویژگی سبب تقویت سیستم ایمنی بدن می‌گردند (گومز و همکاران ۲۰۱۶). مشکلات مربوط به بررسی‌های بالینی آزمون چسبندگی موجب شد تا استفاده از مدل‌های شبیه سازی شده در مقیاس آزمایشگاهی رواج پیدا کند. به خصوص استفاده از توالی سلولی Caco -۲ به منظور ارزیابی چسبندگی سویه‌های پروبیوتیکی

به دستگاه گوارش، بسیار مورد توجه قرار گرفته است، زیرا در این شرایط خواص ریخت‌شناسی و عملکردی سلول‌های روی سطح پرزهای روده کوچک به خوبی مشخص می‌شود (فلاحی و همکاران ۱۳۹۷). نتایج مربوط به ظرفیت تجمع خودکار، انباشتگی سلول و پتانسیل چسبندگی به سلول Caco-۲، سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد پتانسل تجمیع خودکار و انباشتگی به ترتیب ۳۷/۶۰ و ۱۹/۱۰ درصد بود، همچنین پتانسیل چسبندگی به سلول Caco-۲، ۱۱/۳۰ به دست آمد. هاندا و شامارما (۲۰۱۶)، در پژوهش خود دو سویه *Lpb. plantarum* و *L. acidophilus* را به عنوان دو پروبیوتیک با بیشترین خاصیت چسبندگی معرفی کردند. در مطالعه کلادو و همکاران (۲۰۰۶)، میزان چسبندگی باکتری‌های اسید لاکتیک به Caco-۲ بین ۹ تا ۲۰ درصد گزارش شده است. در مطالعه دردمه و همکاران (۱۴۰۰)، درصد چسبندگی به سلول‌های HT-۲۹ برای *Lpb. plantarum* ATCC14917 و ۳۰/۳۲ درصد بود. مطابق مطالعه ژانگ و همکاران چسبندگی سویه‌های *Lpb. plantarum* حداکثر ۳۱ درصد بود. علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۹)، ظرفیت چسبندگی سویه *Lpb. plantarum* L15 را ۱۲/۲ درصد گزارش کردند. Duary و همکاران (۲۰۱۱) چسبندگی لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک به خطوط سلولی آدنوسرکوما کولون انسانی Caco2 و HT-29 را ارزیابی کردند. بر اساس نتایج چسبندگی مستقیم، چسبنده‌ترین سویه به خطوط سلولی HT۲۹- و Caco-۲، *Lpb. plantarum* Lp91 به ترتیب ۱۲/۸ و ۱۰/۲ درصد بود. تجمع خودکار به تجمع سلول‌های باکتریایی از سویه یکسان دلالت دارد و یک ویژگی مهم در تشکیل بیوفیلم و محافظت از سویه در شرایط معده-روده و کلونیزاسیون در روده است (شیخ و همکاران ۲۰۱۶). تجمع خودکار، ارتباط مستقیم با پتانسیل چسبندگی باکتری‌های پروبیوتیک دارد در حالی که انباشتگی تعامل نزدیک با پاتوژن‌ها دارد. همچنین تجمع خودکار خاص هر سویه است و حتی می‌تواند در همان دسته‌بندی نیز متفاوت باشد. در مطالعه زارعی و همکاران (۲۰۲۳)، *Lpb. plantarum* L33 دارای بالاترین تجمع خودکار (۴۹/۵۶٪) بود. رابطه‌ای بین ظرفیت چسبندگی و هیدروفوبیسیته باکتری‌های اسید لاکتیک گزارش شده است. کولادو و همکاران (۲۰۰۷)، نشان دادند که *Lpb. plantarum* IS-10506 و *Lpb. plantarum* IS-20506 با بالاترین و پایین‌ترین درصد چسبندگی به هیدروکربن‌ها، به ترتیب، بیشترین و کمترین تجمع خودکار را نشان دادند. بر اساس بیشتر مطالعات، توانایی تجمع خودکار به گونه و محیط خاص بستگی دارد. این توانایی نتیجه تعاملات فیزیکی و شیمیایی پیچیده است. سلول‌های بزرگتر و سنگین‌تر سریع‌تر رسوب می‌کنند. با این حال، احتمالاً اجزای سطح سلول و بار سطح سلول نقش عمده‌ای در توانایی تجمع خودکار ایفا می‌کنند. علاوه بر این، چندین مطالعه ژن‌هایی که فاکتورهای تقویت‌کننده تجمع را در گونه‌های لاکتوباسیلوس کدگذاری می‌کنند، توصیف کرده‌اند (هان وهمکاران ۲۰۱۷). انباشتگی سلولی ایزوله‌های باکتری‌های اسید لاکتیک با پاتوژن‌ها ممکن است به دلیل اجزای سطح سلول باشد، اما برای درک دقیق این پدیده نیاز به مطالعات بیشتری است. این پدیده ممکن است به دلیل تعاملات بین اجزای کربوهیدرات-لکتین و پروتئینی در سطح سلول باشد (شارما و همکاران ۲۰۱۷). با توجه به اینکه باکتری‌های اسید لاکتیک و باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت دارای مورفولوژی دیواره سلولی مشابهی هستند، لایه ضخیم پپتیدوگلیکان و طبیعت هیدروفوبیک آن‌ها باعث می‌شود که به راحتی به‌هم متصل شوند که می‌تواند توضیحی برای توانایی هم‌تجمعی مؤثر آن‌ها در برابر باکتری‌های گرم مثبت باشد (ابوشلابی ۲۰۱۷). با این حال، زمان انکوباسیون و سویه (پروبیوتیک و پاتوژن) بر درصدهای انباشتگی سلولی تأثیر دارد. او و همکاران (۲۰۲۲)، گزارش کردند که *Lpb. plantarum* پس از ۳ ساعت، ۵۰٪ فعالیت انباشتگی نشان داد. در مطاله زارعی و همکاران (۲۰۲۳)، *E. faecium* L13، *Lpb. pentosus* L11 و *Lpb. plantarum* L33 انباشتگی سلولی قابل توجهی نسب به *S. typhimurium* و *L. monocytogenes* نشان دادند.

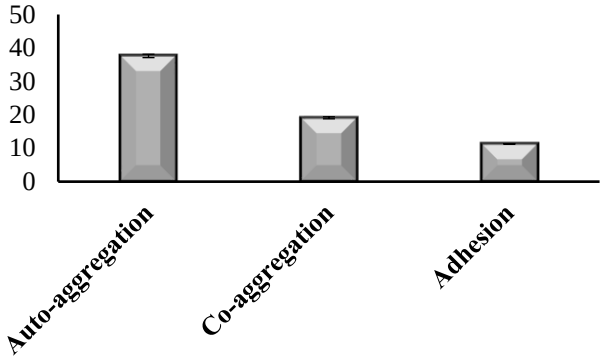

Fig 2– Auto-aggregation, co-aggregation and adhesion capacity ability of *Lactiplantibacillus plantarum* MOHA1

جذب کلسترول

میزان توانایی *Lpb. plantarum* MOHA1 در کاهش میزان کلسترول ۰/۵۵ ± ۴۰/۳۰ درصد بود. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که برخی از باکتری‌های لاکتیک اسید در محیط کشت سلولی قادر به کم کردن غلظت کلسترول در محیط هستند. در برخی از مطالعات به دنبال این کاهش ، تغییر در الگوی اسیدهای چرب داخل سلول مشاهده شده است و در برخی حتی مشاهده میکروسکوپیک سلول، رسوب و اتصال کلسترول با سطح باکتری را نشان داده است وجود چنین سویه‌هایی به عنوان کشت آغازگر در غذاهایی که منبعی از کلسترول محسوب میشوند بسیار مفید واقع می‌شود (مدنی و همکاران ۱۳۹۲). گروه دوم از مکانیسم‌های کاهنده کلسترول مربوط به اثرگذاری بر متابولسم کلسترول، تولید اسیدهای چرب و تولید آنزیم هیدرولیز کننده نمکهای صفراوی است. در مورد توانایی هیدرولیز نمک‌های صفراوی می‌توان گفت که این توانایی به تولید اسیدهای چرب غیر مزدوج می‌انجامد و ذکر شده است که اسیدهای صفراوی غیر مزدوج حلالیت کمتری نسبت به انواع مزدوج داشته و کمتر در روده جذب شده و در نتیجه غلظت آنها در کبد و صفرا کاسته شده و بدن برای جبران کمبود آنها از کلسترول خون استفاده می کند (پریرا و همکاران ۲۰۰۳). درجانگ گو و همکاران (۲۰۲٤)، ۱۰۷ سویه از *Lpb. plantarum* که از سه زیستگاه مختلف (۲۰ سویه از محصولات لبنی تخمیری، ۲۳ سویه از تخمیر انگور و ٦٤ سویه از سبزیجات تخمیری) جدا شده بودند، جهت ارزیابی ویژگی‌های بالقوه کاهش‌دهنده کلسترول مورد مقایسه قرار گرفتند. بر اساس نتایج به طور کلی، سویه‌های مشتق شده از محصولات لبنی تخمیری پتانسیل بیشتری برای کاهش کلسترول نسبت به سویه‌های جدا شده از دو زیستگاه دیگر داشتند.

در مطالعه‌ای دیگر *Lpb. plantarum* ECGC13110402 به دلیل فعالیت بالای هیدرولاز نمک صفرا و توانایی کاهش کلسترول به عنوان یک پروبیوتیک است در ١٦ بزرگسال مبتلا به هیپرکلسترولمی بررسی شد. پس از ٦ هفته مصرف روزانه کاهش‌های زیستی و آماری معناداری در کلسترول کل در مقایسه با دارونما مشاهده شد. هیچ تغییری در نشانگرهای عملکرد کبد و ویتامین Dو هیچ اثر جانبی در طول مطالعه مشاهده نشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که *Lpb. plantarum* ECGC 13110402می‌تواند به طور ایمن پروفایل لیپیدی را در افراد مبتلا به دیس‌لیپیدمی بهبود بخشد (فنتس وهمکاران ۲۰۱۲).

ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی DPPH و ABTS

جهت کنترل رادیکال‌های آزاد، انتخاب آنتی‌اکسیدان مناسب ضروری به نظر می‌رسد. آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی در آزمایشگاه به منظور تقلید واکنش‌های اکسیداسیون-احیا که در سامانه های بیولوژیکی زنده اتفاق می‌افتد طراحی شده و برای ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های مختلف شیمیایی و بیولوژیکی استفاده می‌شود (نوشاد و علیزاده بهبهانی ١٤٠٠). در مطالعات بسیاری به نقش باکتری‌های اسیدلاکتیک و متابولیت‌های حاصل از آنها به عنوان آنتی‌اکسیدان در حفظ سلامت انسان و اجتناب از برخی بیماری‌ها اشاره شده است. میزان درصد مهار رادیکال‌های آزاد توسط *Lpb. plantarum* MOHA1 در شکل ۳، نشان داده شده است. ویژگی آنتی‌اکسیدانی سویه‌های *Lpb. plantarum* در پژوهش‌های مختلف گزارش شده است.

ایسید و همکاران (۲۰۰۹)، ویژگی‌های تکنولوژیکی و فعالیت ضیدمیکروبی ۱۷ سویه *Lpb. plantarum* جدا شده از نوعی گوشت نمک سود شده را بررسی کردند و بیشترین فعالیت بازداری سویه‌های *Lpb. plantarum* را علیه باکتری *staph.*

aureus مشاهده نمودند. در مطالعه‌ای دیگر لی و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت آنتی اکسیدانی و مقاومت سویه‌های *Lpb. plantarum* جدا شده از غذاهای تخمیری چین را در برابر هیدروژن پراکسید مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بسته به نوع نژاد و منشاء جداسازی متفاوت بود. در مطالعه شهرام‌پور و همکاران (۱۳۹۸)، گزارش شد که تمامی سلول‌های نژادهای مختلف *Lpb. plantarum* و روماند فیلتر شده فاقد سلول حاصل از آنها از خاصیت آنتی‌اکسیدانی خوبی برخوردار بودند.

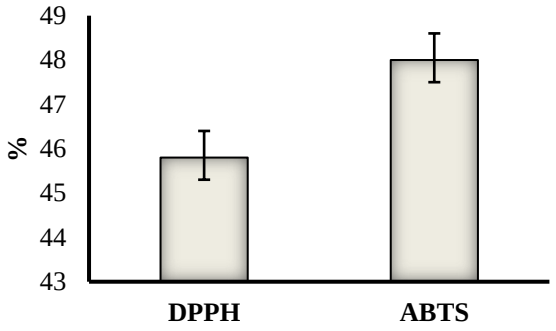

Fig 3- The antioxidant activity (DPPH & ABTS) of *Lactiplantibacillus plantarum* MOHA1

حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها

انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک بین گونه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک گزارش شده است. از این جهت نگرانی‌هایی برای استفاده از این باکتری‌ها در مواد غذایی وجود دارد. یک جنبه مهم در ارزیابی باکتری‌های پروبیوتیک مقاومت آنها به آنتی‌بیوتیک‌های معمول است، زیرا این موضوع می‌تواند بر مناسب بودن آن‌ها جهت مصارف غذایی تأثیر بگذارد (برزگر و همکاران ۲۰۲۱). مقاومت سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 به هشت آنتی‌بیوتیک رایج مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲). سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 تقریباً نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بود و تنها نسبت به Penicillin از خود مقاومت نشان داد. سویه نسبت به آنتی‌بیوتیک Imipenem نیمه حساس بود. شواهدی وجود دارد که گونه‌های لاکتوباسیلوس معمولاً به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند Erythromycin، Chloramphenicol و Tetracycline حساس هستند (علیزاده بهبهانی و همکاران ۲۰۲۳). در مطالعه‌ای پالانیاندی و همکاران(۲۰۱۷)، ویژگی‌های پروبیوتیکی سه سویه *Lpb. plantarum* (MJM60319, MJM60298, MJM60399) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه بیان داشت سه سویه مذکور به آنتی‌بیوتیک‌های رایج حساس بودند. در مطالعه کیم و همکاران(۲۰۲۱)، نیز حساسیت به آنتی‌بیوتیک در سویه‌های باکتری اسید لاکتیک، که به عنوان یک ویژگی پروبیوتیک در نظر گرفته می‌شود، ارزیابی شد و بیان گردید سطح مقاومت به آنتی‌بیوتیک می‌تواند در بین سویه‌های مختلف و حتی درون زیرگونه‌ها متفاوت باشد.

Table 2- The Effect of common antibiotics on the growth of *Lactiplantibacillus plantarum* MOHA1

Antibiotic	*Lpb. plantarum MOHA1*
Vancomycin	Sensitive
Gentamicin	Sensitive
Chloramphenicol	Sensitive
Nitrofurazone	Sensitive
Nalidixic	Sensitive
Penicillin	Resistant
Imipenem	Intermediate
Ciprofloxacin	Sensitive

تولید آمین بیوژنیک

نتایج نشان داد سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 توانایی تولید آمین بیوژنیک را نداشت. آمین‌های بیوژنیک بازهای آلی با فعالیت بیولوژیکی هستند که به طور عمده توسط دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه تولید می‌شوند. تولید آمین‌های بیوژنیک در مواد غذایی نیازمند در دسترس بودن پیش سازها به عبارت دیگر اسیدهای آمینه، حضور میکروارگانیسم‌ها با آنزیم آمینواسیددکربوکسیلاز و شرایط مطلوب برای رشد و فعالیت دکربوکسیلازی آن‌ها است. مهم‌ترین آمین‌های بیوژنیک از نظر کمی و کیفی در موادغذایی و سبزیجات عبارت‌اند از هیستامین، تیرامین، پوترسین، کاداورین و بتا فنیل‌اتیل آمین که توسط دکربوکسیلاسیون هیستیدین، تیروزین، اورنیتین، الیزین و بتا فنیل آلانین تولید می‌شوند. آمین های بیوژنیک در طیف وسیعی از مواد غذایی شامل فرآورده‌های گوشتی و دریایی، محصولات لبنی، سبزیجات، میوه‌ها و آجیل حضور دارند

(فرخنده و یاورمنش ۱۳۹۹). مصرف غذاهای حاوی مقادیر زیاد از آمین‌های بیوزنیک ممکن است منجر به اثر سمی مانند سردرد، مشکلات کلیوی، مسمومیت، حالت تهوع، افت فشار خون و فشار خون بالا و در موارد شدید خونریزی داخلی مغز و یا مرگ شود (میلریو و همکاران ۲۰۱۹). سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 تولید آمین بیوژنیک از خود نشان نداد. در مطالعه ماخامورانگ و همکاران (۲۰۲۱)، موثر بودن کشت استارتر *Lpb. plantarum* SK15 در جلوگیری از تولید آمین‌های بیوژنیک مانند پوتریسین و اسپرمیدین در فرآیند تخمیر نوشیدنی قارچی با استفاده از قارچ هریسیوم بررسی شد. نوشیدنی قارچ به صورت خودبخودی و با استفاده از استارتر به طور موازی تخمیر شد. علاوه بر تغییراتpH ، محتوای کل اسیدیته، محتوای الکل، محتوای آمینو اسید، محتوای قندهای کاهنده، محتوای فنولیک کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بار میکروبی در چندین نقطه نمونه‌برداری و در طول فرآیند تخمیر ۷۲۰ ساعته مورد بررسی قرار گرفت. در نتیجه، استارتر *Lpb. plantarum* SK15از تجمع آمین‌های بیوژنیک در طول تخمیر نوشیدنی قارچ جلوگیری کرد. علاوه بر این، نوشیدنی قارچ تخمیر شده با استارتر توانست pH و محتوای الکل را در سطح قابل قبولی کنترل کند. نوشیدنی قارچ با *Lpb. plantarum* SK15 دارای سطح بالاتری از محتوای فنولیک کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود.

تست دئوکسی ریبونوکلئاز و عدم فعالیت همولیتیک

بر اساس نتایج به دست آمده، تولیدDNase توسط *Lpb. plantarum* MOHA1 منفی بود، این امر می‌تواند نشان دهنده پتانسیل آن در تهیه پروبیوتیک باشد. همچنین پاسخ به‌دست آمده از فعالیت همولیتیکی نیز منفی بود. در مطالعه‌ای که پالانیاندی و همکاران (۲۰۱۷)، ویژگی‌های پروبیوتیکی سه سویه *Lpb. plantarum* (MJM60319, MJM60298, MJM60399) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه بیان داشت سه سویه مذکور هیچگونه تولید بیوآمین، فعالیت موسی نولیتیک و همولیتیک نشان ندادند. مطالعه کنفاک و همکاران (۲۰۱۸)، با هدف ارزیابی ایمنی، چسبندگی و خواص آنتی‌اکسیدانی پنج سویه *Lpb. plantarum* جدا شده از دستگاه گوارش زنبورهای عسل نیز نشان داد که پنج سویه باکتری (*Lpb. plantarum* H15, H21, H24, H47 and H28) مورد بررسی غیر همولیتیک بودند.

ارزیابی فعالیت ضدباکتری سویه *Lpb. plantarum* MOHA1

اثر ضدباکتریایی پروبیوتیک‌ها را می‌توان به متابولیت‌هایی مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دی استیل، اتانول و فنل‌ها نسبت داد (علیزاده بهبهانی و همکاران، ۱۴۰۳). اثر ضدمیکروبی *Lpb. plantarum* MOHA1 اسیدی و غیراسیدی بر سویه‌های پاتوژن به روش انتشار در آگار به کمک دیسک و چاهک در شکل‌های ٤ و ٥ نشان داده شده است. در هر دو روش بیشترین اثر بازدارندگی روی *L. monocytogenes* بود. این باکتری بی‌هوازی اختیاری است و قادر به زنده ماندن در بود و نبود اکسیژن است و به عنوان عامل ایجاد کننده طیف وسیعی از بیماری‌ها در انسان و حیوانات است. کمترین میزان بازدارندگی نیز در روش انتشار در آگار به روش دیسک بر پاتوژن‌های *S. typhimurium* و *E.coli* و در روش انتشار در آگار به کمک چاهک بر پاتوژن *E.coli* بود. باکتری‌های گرم منفی روده‌ای از قبیل *E.coli* و *S. typhimurium* از مهمترین عوامل ایجاد مسمومیت‌های غذایی و اسهال می‌باشند. میکروارگانیسم‌ها در مراحل رشد خود متابولیت‌های متعددی تولید می‌کنند که معمولاً مسئول حفظ بقای آنها هستند. باکتری‌های پروبیوتیک نیز در طی فرآیند تخمیر و همچنین در دستگاه گوارش زنده می‌مانند و تکثیرپیدا می‌کنند (وسیعی و همکاران ۲۰۲۲). پروبیوتیک‌ها متابولیت‌های ضد میکروبی مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دی‌استیل، اتانول، فنول‌ها و باکتریوسین‌ها را در محیط خود آزاد می‌کنند تا از طریق یک مکانیسم حذف رقابتی، باکتری‌های بیماری‌زا را از بین ببرند (فو وهمکاران ۲۰۲۲). گوبتا و همکاران (۲۰۲۱)، هشت گونه از باکتری‌های اسید لاکتیک را از نمونه‌های شیدال جدا کردند و CFS خنثی و غیر خنثی آن‌ها را علیه چهار سویه باکتری‌های بیماری‌زا بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که استفاده از CFS اسیدی منجر به فعالیت بهینه ضد میکروبی شد. با این حال، CFS خنثی رفتار متفاوتی نشان داد به طوری که برخی سویه‌ها هیچ

فعالیتی نشان ندادند و برخی سویه‌ها فعالیت ضد میکروبی ضعیفی داشتند. باکتریوسین‌ها به طور خاص در برابر رشد پاتوژن‌های گرم مثبت فعال هستند، در حالی که پراکسید هیدروژن، اسیدهای چرب هیدروکسیل و اسیدهای آلی فعالیت‌های ضد میکروبی بیشتری در برابر باکتری‌های گرم منفی ارائه می‌دهند . برزگر و همکاران (۲۰۲۱) گزارش دادند که سویه‌های *L. acidophilus* جدا شده از پنیرهای شیر خام ایرانی توانایی مهار رشد شش سویه بیماری زا از جمله *S. aureus* و *E. coli* را دارند. علاوه بر این، در پژوهش ریو و همکاران (۲۰۱۳)، ثابت شده است که *Lpb. plantarum* AF1 و *Lpb. plantarum* NO1 دارای ویژگی‌های ضد باکتریایی برجسته‌ای علیه *S. aureus*، *E.coli*، *L. monocytogenes* و *S. typhimurium* هستند که عمدتاً به دلیل تشکیل ترکیبات مهاری مانند باکتریوسین‌ها، CO_2، H_2O_2، اسیدهای آلی و-δدودکالاکتون است.

خاصیت ضدچسبندگی سلول

در پژوهش حاضر پتانسیل Lpb. plantarum MOHA1، در رقابت، مهار و جابه‌جایی چسبندگی در مقابل پاتوژن *E. coli* ارزیابی شد. نتایج این ارزیابی در شکل ٦، نشان داده شده است. زمانی که *Lpb. plantarum* MOHA1 به چاهک به طور همزمان با *E. coli* اضافه شد ۳٦/۷ درصد از چسبندگی پاتوژن کاهش یافت. زمانی که *Lpb. plantarum* MOHA1 ابتدا به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۱ ساعت انکوباسیون، سویه بیماری‌زا اضافه شد، ۳۵/۵ درصد چسبندگی سویه پاتوژن کاهش یافت. زمانی که *E. coli* برای اولین‌بار به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۱ ساعت انکوباسیون، *Lpb. plantarum* MOHA1 به چاهک‌ها اضافه شد، سویه پروبیوتیک قادر به حذف ۲۲/٤ درصد از باکتری‌های پاتوژن متصل به سلول‌های Caco-۲ شد. باکتری‌های پاتوژن برای ایجاد عفونت باید به دیواره سلولی روده متصل شوند. بنابراین، هر گونه عواملی که از این فعالیت جلوگیری کنند، اثرات مفید برای سلامتی ایجاد می‌کنند و با توسعه عفونت مداخله می‌کنند. باکتری‌های پروبیوتیک از طریق برخی از مکانیسم‌ها از جمله تولید ترکیبات ضد میکروبی و از بین بردن یا مسدود کردن مولکول‌های گیرنده مسیریابی عامل‌های پاتوژن از طریق ترشح ترکیباتی که باعث مسدود شدن عوامل چسبنده می‌شوند، از چسبندگی باکتری‌های پاتوژن جلوگیری می‌کنند (وسیعی و همکاران ۲۰۲۲). در مطالعه ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی از سویه‌های لاکتوباسیلوس اصیل جدا شده از کشک زرد زابلی که توسط وسیعی و همکاران (۲۰۲۲) انجام شد، نتایج نشان داد که در هر دو آزمایش رقابت و مهار، *Lpb. plantarum* TW57-4 بیشترین فعالیت را علیه *P. aeruginosa* داشته است. مشاهدات لاز و همکاران (۲۰۲۱) در مورد پتانسیل چسبندگی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده به سلول‌های Caco-۲ و درصد کاهش چسبندگی *S. enterica* نشان داد که سویه‌های *Lpb.plantarum* 5H1 ، *Lpb. plantarum* 5 L1 و *Lcb. rhamnosus* GG کاهش بیشتری در چسبندگی سالمونلا در محدوده ٥٦٪–۷۳٪ داشتند.

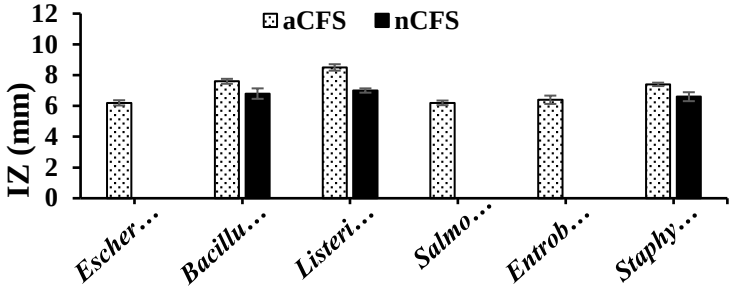

Fig. 4. The antimicrobial effect of *Lactiplantibacillus plantarum* MOHA1 using disk diffusion agar. The abbreviations aCFS and nCFS stand for acid cell-free supernatants and neutralized cell-free supernatants, respectively

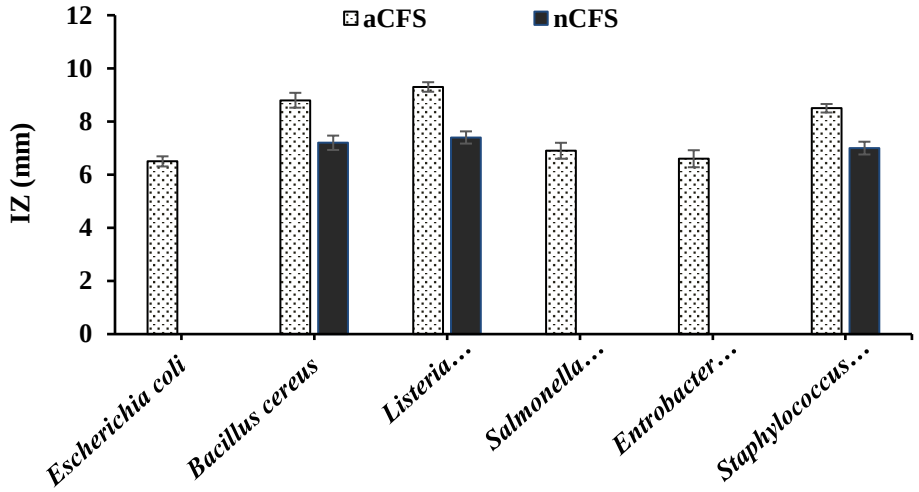

Fig. 5. The antimicrobial effect of *Lactiplantibacillus plantarum* MOHA1 using well diffusion agar. The abbreviations aCFS and nCFS stand for acid cell-free supernatants and neutralized cell-free supernatants, respectively

نتیجه گیری

سویه‌های جداسازی شده از فرآورده‌های تخمیری محلی و محصولات لبنی به عنوان یکی از منابع با ارزش پروبیوتیک‌ها شناخته می‌شوند. این سویه‌ها نه تنها پتانسیل پروبیوتیکی بالایی دارند، بلکه خواص ضد میکروبی قابل توجهی را نیز از خود نشان می‌دهند. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، *Lpb. plantarum* MOHA1 می‌تواند در شرایط اسیدی معده و در حضور نمک‌های صفراوی مقاومت خوبی داشته باشد، که این ویژگی‌ها برای بقا و عملکرد موثر در دستگاه گوارش انسان ضروری است. این سویه قابلیت بالایی در مهار باکتری‌های بیماری‌زا از خود نشان داد که این خاصیت به دلیل تولید

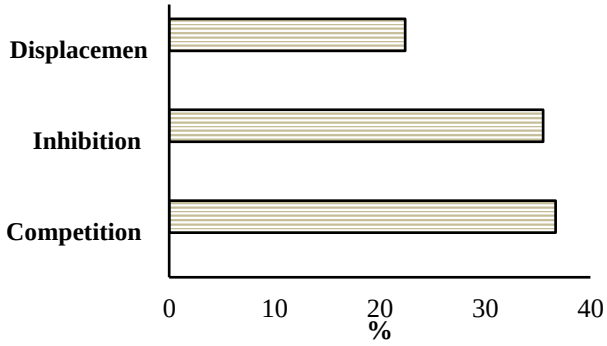

Fig 6. Anti-adhesion assays (competition, inhibition and displacement) of *Lactiplantibacillus plantarum* MOHA1 against *Escherichia coli*

ترکیبات ضد میکروبی است که می‌توانند رشد و تکثیر پاتوژن‌ها را مهار کنند. همچنین، *Lpb. plantarum* MOHA1 در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج حساس است که این موضوع می‌تواند در کنترل عفونت‌ها و جلوگیری از مقاومت میکروبی مفید باشد. از دیگر ویژگی‌های مهم این سویه می‌توان به توانایی چسبندگی به دیواره روده، هیدروفوبیستی سطحی، تجمع خودکار و انباشتگی اشاره کرد. این ویژگی‌ها به این سویه این امکان را می‌دهند که به سطح سلول‌های روده بچسبند و کلونی‌های مقاومی را تشکیل دهند که می‌توانند به بهبود سلامت دستگاه گوارش و تقویت سیستم ایمنی بدن کمک کنند.با توجه به این ویژگی‌ها، سویه *Lpb. plantarum* MOHA1 پتانسیل بالایی برای استفاده به‌عنوان مکمل پروبیوتیکی در کشت‌های تخمیری و یا به عنوان کشت همراه در فرایند تولید محصولات غذایی تخمیری دارد. استفاده از این سویه می‌تواند به بهبود کیفیت محصولات غذایی، افزایش ماندگاری آن‌ها و ارتقاء سلامت مصرف‌کنندگان کمک کند. انجام تست‌های تاییدی بیشتر و تحقیقات جامع‌تر می‌تواند کاربردهای عملی و تجاری این سویه‌ها را در صنایع غذایی تقویت کند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت مالی طرح پژوهشی به‌شماره ۱٤۰۲/٤٤ که این مقاله مستخرج از آن می‌باشد، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

تکلو ز، گودرزوند م و خدایی ز. ۱۳۹۵. بررسی قابلیت چسبندگی باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس کازئی به لایه سلولی Hep2 cell. فصلنامه علمی پژوهشی دنیای میکروب ها. مقاله۳۰، دوره ۱۹، شماره ۱.

دردمه ن، یاورمنش م، معظمی ع ع، مقدم متین م و نوربخش ح. ۱٤۰۱. ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی سویه‌های تجاری لاکتوباسیلوس پلانتاروم و بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس در شرایط برون‌تنی. مجله علوم و صنایع غذایی ایران. ۱٤۰۱; ۱۹ (۱۳۳) :۱۰۲-۹۱

عبداللهی ن وتدینی م. ۱٤۰۰. تاثیر لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر تغییر خصوصیات شیمیایی و میکروبی زیتون طی عمر ماندگاری. نشریه پژوهش های صنایع غذایی. جلد ۳۱، شماره ۳، ۱۸۳-۱٦۵

علیزاده بهبهانی ب، حجتی م و گودرزی شمس آبادی ب. ۱٤۰۳. بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدمیکروبی *Levilactobacillus brevis* NKN55 جداسازی شده از ماست محلی. نشریه پژوهش های صنایع غذایی. جلد ۳٤ شماره۲، ۱۲۰-۱۰۱.

علیزاده بهبهانی ب، نوشاد م و جوینده ح. ۱۳۹۹. بررسی ویژگی‌های عملکردی باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی CE 28.26 و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس BCRC10695 جدا شده از ماست محلی شهرستان بهبهان و تعیین فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها علیه باکتری‌های پاتوژن شاخص غذایی، فصلنامه میکروبیولوژیِ کاربردی در صنایع غذایی. دوره ۷، شماره۱، ۱٦-۱.

علیزاده بهبهانی ب و نوشاد م. ۱٤۰۰. جداسازی و شناسایی سویه های لاکتوباسیل از پنیر محلی بهبهان و بررسی ویژگی های تکنولوژیکی و ضد میکروبی آن ها علیه پاتوژن های شاخص غذایی. علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. ۱٤۰۰; ۱٦ (۱) :۱٤۲-۱۳۳

عیسوندحیدری ا، جوینده ح، حجتی م، علیزاده بهبهانی ب و نوشاد م. ۱٤۰۰. بررسی خواص ضدمیکروبی و قابلیت زندهمانی LZ95 *Lactobacillus plantarum* در شرایط اسیدی و صفراوی. مجله پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران ۱۷(٤)۵۳۳-۵٤۱

فرخنده ت و یاورمنش م. ۱۳۹۹. آمین های بیوژنیک در فرآورده های لبنی، دهمین همایش سراسری کشاورزی و منابع طبیعی پایدار،تهران.

فلاح ف، مرتضوی س ع و طباطبایی یزدی ف. ۱۳۹۸. بررسی خواص پروبیوتیکی باکتری لاکتوباسیلوس برویس سویه PML۱بر پایه توانایی چسبندگی آن به سلول‌های اپیتلیال روده، فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی دوره ۵ شماره ۱،صفحات ۵۳-۴۱

مدنی گ، میرلوحی م و یاحی م .۱۳۹۲. بررسی قابلیت کاهش کلسترول توسط سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم با قابلیت پروبیوتیکی در محیط آزمایشگاهی. تحقیقات نظام سلامت. ۱۳۹۲.

نوشاد م و علیزاده بهبهانی ب. ۱٤۰۰. اسانس زولنگ: فنل و فلاونوئید کل، قدرت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضدمیکروبی و برهمکنش آن با آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید در شرایط آزمایشگاهی. مجله علوم و صنایع غذایی ایران. ۱۸ (۱۱۸) :۲٦۳-۲۷۱.

نوشاد م، علیزاده بهبهانی ب و حجتی م. ۱٤۰۰. بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی و تکنولوژیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از دوغ بومی بهبهان، مجله پژوهش‌های صنایع غذایی. دوره ۳۱، شماره ٤. ۱۸٦-۱٦۹

واسچی ن، ایرانمنش م ، حاج قاسمی م، کریمی ترشیزی م ا و مژگانی ن. ۱۳۹۹. اندازه گیری میزان آبگریزی، چسبندگی و کلونیزاسیون لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی در شرایط آزمایشگاهی، نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره شانزدهم، شماره اول۳۱-۲۱

Abushelaibi A, Al-Mahadin S, El-Tarabily K, Shah N.P and Ayyash M, 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. LWT—Food Sci. Technol. 2017, 79, 316–325.

Abushelaibi A, Al-Mahadin S, El-Tarabily K, Shah N. P and Ayyash M, 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. LWT-Food Science and Technology 79, 316–325.

Acevedo-Fani A and Singh H, 2022. Biophysical insights into modulating lipid digestion in food emulsions. Prog. Lipid Research. 2022, 85, 101129

Alizadeh Behbahani B, Jooyandeh H, Hojjati M and Ghodsi Sheikhjan M, 2023. Evaluation of probiotic, safety, and anti-pathogenic properties of *Levilactobacillus brevis* HL6, and its potential application as bio-preservatives in peach juice. Food Science and Technology 191 (2024) 11560.

Alizadeh Behbahani B, Noshad M and Falah F, 2019. Inhibition of Escherichia coli adhesion to human intestinal Caco2 cells by probiotic candidate Lactobacillus plantarum strain L15. Microbial Pathogenesis 136: 1-7.

Alizadeh Behbahani B, Jooyandeh H, Falah F aand Vasiee A, 2020. Gamma-aminobutyric acid production by Lactobacillus brevis A3: Optimization of production, antioxidant potential, cell toxicity, and anti-microbial activity. Food Science & Nutrition, *8*(10), 5330-5339.

Alizadeh Behbahani B, Jooyandeh H, Vasiee A and Zeraatpisheh F, 2023. Evaluation of anti-yeast metabolites produced by Lactobacillus strains and their potential application as bio-preservatives in traditional yogurt drink. LWT-Food Science and Technology, 188, 115428.

Barzegar H, Alizadeh Behbahani B, Falah F, 2021. Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of Lactobacillus strains isolated from Iranian raw milk cheeses. Food Science & Nutrition published 2021; 9:4094–4107.

Boricha A, Shekh S. L, Pithva S. P, Ambalam P. S and Vyas B. R. M, 2019. In vitro evaluation of probiotic properties of Lactobacillus species of food and human origin. LWT-Food Science and Technology 10*6*, 201–208.

Collado M.C, Surono I, Meriluoto J and Salminen S, 2007 Indigenous Dadih Lactic Acid Bacteria: Cell-Surface Properties and Interactions with Pathogens. J. Food Sci. 2007, 72, 89–93. Differences among Lactiplantibacillus plantarum strains isolated from different fermented foods in their potential cholesterol-lowering properties, Food Bioscience, Volume 59, 2024, 103847, ISSN 2212-4292,

Ding W and Shah N, 2007. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. journal. Food Science. 2007;72:M446–M450.

Essid I, Medini M and Hassouna M, 2009. Technological and safety properties of Lactobacillus plantarum strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. Meat Sci. 2009; 81(1):203-8. 14.

Li S, Zhao Y, Zhang L, Zhang X, Huang L, Li D, Niu C, Yang Z and Wang Q, 2012. Antioxidant activity of Lactobacillus plantarum strains isolated from traditional Chinese fermented foods. Food chemist. 2012; 1;135(3):1914-9.

Falah F, Vasiee A, Alizadeh Behbahani B, Tabatabaee Yazdi F and Mortazavi SA, 2021. Optimization of gamma-aminobutyric acid production by Lactobacillus brevis PML1 in dairy sludge-based culture medium through response surface methodology. Food science & nutrition. 2021[a] Jun;9(6):3317-26.

Falah F, Vasiee A, Alizadeh Behbahani B, Yazdi F. T, Moradi S, Mortazavi S. A and Roshanak S, 2019. Evaluation of adherence and anti-infective properties of Optimization of the new formulation of ice cream with native Iranian seed gums (*Lepidium perfoliatum* and *Lepidiumsativum*) using response surface methodology (RSM). Journal of Food Science and Technology 54(1), 196-208.

Falah F, Vasiee A, Yazdi FT and Behbahani BA, 2021. Preparation and functional properties of synbiotic yogurt fermented with Lactobacillus brevis pml1 derived from a fermented cereal-dairy product. BioMed research international. 2021[b] Aug 12;2021.

Feyhl-Buska J, Chen Y, Jia C, Wang J.-X Zhang C.L and Boyd E.S, 2016. Influence of growth phase, pH, and temperature on the abundance and composition of tetraether lipids in the thermoacidophile Picrophilus torridus. *Front. Microbiol.* 2016; 7:1323. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01323

Fu B, Huang X, Ma J, Chen Q, Zhang Q and Yu, P, 2022. Characterization of an inositol-producing Lactobacillus plantarum strain and the assessment of its probiotic potential and antibacterial activity. LWT-Food Science and Technology, 153, 1–7.

Fuentes MC, Lajo T, Carrión JM and Cuñé J, 2012. Cholesterol-lowering efficacy of Lactobacillus plantarum CECT 7527, 7528 and 7529 in hypercholesterolaemic adults. British Journal of Nutrition. 28;109(10):1866-72.

Han Q, Kong B, Chen Q, Sun F and Zhang H, 2017. In vitro comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. Journal of Functional Foods. 2017, 32, 391–400.

Handa S and Sharma N, 2016. In vitro study of probiotic properties of Lactobacillus plantarum F22 isolated from chhang–A traditional fermented beverage of Himachal Pradesh, India. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2016 Jun 1;14(1):91-7.

Kardooni Z, Alizadeh Behbahani B, Jooyandeh H and Noshad M, 2023. Assessing Protection Mechanisms against Escherichia coli by Analyzing Auto-and Co-Aggregation, Adhesion Ability, Antagonistic Activity and Safety Characteristics of Potentially Probiotic Lactobacillus acidophilus B103. Nutrition and Food Sciences Research 2023; 10 (1) :11-21

Kenfack Ch, Francois Z, Marie K, Wang Y, Zhu T and Yin Li, 2018. Safety and Antioxidant Properties of Five Probiotic Lactobacillus plantarum Strains Isolated from the Digestive Tract of Honey Bees. American Journal of Microbiological Research. 6. 1-8. 10.12691/ajmr-6-1-1.

Khalesi S, Bellissimo N, Vandelanotte C, Williams S, Stanley D and Irwin C, 2018. A review of probiotic supplementation inhealthy adults: helpful or hype? European Journal of Clinical Nutrition, 2018. 73(1): p. 24-37.

Kim K. T, YangS. J, and Paik, H. D, 2021. Probiotic properties of novel probiotic Levilactobacillus brevis KU15147 isolated from radish kimchi and its antioxidant and immune-enhancing activities. Food Science and Biotechnology, 30, 257–265.

Li S, Zhao Y, Zhang L, Zhang X, Huang L, Li D, Niu C, Yang Z and Wang Q, 2012. Antioxidant activity of Lactobacillus plantarum strains isolated from traditional Chinese fermented foods. Food chemist. 2012; 1;135(3):1914-9.

Luz C, Calpe J, Quiles J.M, Torrijos, R, Vento and M, Gormaz, M, 2021. Probiotic characterization of Lactobacillus strains isolated from breast milk and employment for the elaboration of a fermented milk product. Journal of Functional Foods, 84, 1–9.

Meurman J and Stamatova I, 2007. Probiotics: contributions to oral health. Oral Diseases. 13**:** 443-451

Milheiro J, Ferreiraa L C, Filipe-Ribeiroa L, Cosmeb F, Nunes F.N, 2019. A simple dispersive solid phase extraction clean-up/concentration method for selective and sensitive quantification of biogenic amines in wines using benzoyl chloride derivatisation. Food Chemistry 274 (2019) 110–117.

Mulaw G, Sisay Tessema T, Muleta D and Tesfaye A, 2019. In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented Ethiopian food products. International Journal of Microbiology 7179514. https://doi.org/10.1155/2019/7179514

Olatunde O. O, Obadina A. O, Omemu A. M, Oyewole O. B, Olugbile A and Olukomaiya O. O, 2018. Screening and molecular identification of potential probiotic lactic acid bacteria in effluents generated during ogi production. Annals of Microbiology, 68(7), 433–443. https://doi.org/10.1007/s1321 3-018-1348-9.

Ou D, Ling N, Wang X, Zou Y, Dong J, Zhang D, Shen Y and Ye Y, 2022. Safety Assessment of One Lactiplantibacillus plantarum Isolated from the Traditional Chinese Fermented Vegetables—Jiangshui. Foods 2022, 11, 2177.

Palaniyandi S.A, Damodharan K and Suh JW, 2017. In Vitro Characterization of Lactobacillus plantarum Strains with Inhibitory Activity on Enteropathogens for Use as Potential Animal Probiotics. Indian journal Microbiol 57, 201–210 (2017). https://doi.org/10.1007/s12088-017-0646-4.

Parente E, Ciocia F, Ricciardi A, Zotta T, Felis G.E and Torriani S, 2010. Diversity of stress tolerance in Lactobacillus plantarum, Lactobacillus pentosus and Lactobacillus paraplantarum: A multivariate screening study. International Journal of Food Microbiology. 2010; 144:270–279.

Pereira DI, McCartney AL and Gibson GR, 2003. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salthydrolyzing lactobacillus fermentum strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. Appl Environ Microbiol 2003 Aug;69(8):4743-52.

Ryu EH and Chang HC, 2013. In vitro study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from kimchi. Annals of Microbiology. 2013;63:1387-95.

Rodríguez-Pazo N, Vázquez-Araújo L, Pérez-Rodríguez N, Cortés-Diéguez S and Domínguez JM, 2013. Cell-free supernatants obtained from fermentation of cheese whey hydrolyzates and phenyl pyruvic acid by *Lactobacillus plantarum* as a source of antimicrobial compounds, bacteriocins, and natural aromas. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2013;171(4):1042-60.

Rouhi R, Falah F, Azghandi M, Alizadeh Behbahani B, Mortazavi S A, Tabatabaei-Yazdi F and Vasiee A, 2024. Investigating the effect of Lactiplantibacillus plantarum TW57-4 in preventing biofilm formation and expression of virulence genes in Listeria monocytogenes ATCC 19115, LWT, Volume 191,2024,115669

Saboktakin-Rizi M, Alizadeh Behbahani B, Hojjati, M and Noshad M, 2021. Identification of *Lactobacillus plantarum* TW29-1 isolated from Iranian fermented cereal-dairy product (Yellow Zabol Kashk): probiotic characteristics, antimicrobial activity and safety evaluation. Journal of Food Measurement and Characterization (2021) 15:2615–2624

Saboori B, Shahidi F, Hedayati S and Javadmanesh A, 2022. Investigating the Probiotic Properties and Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from an Iranian Fermented Dairy Product, Kashk. Foods 2022, 11, 3904.

Sharma K, Sharma N, Sharma R, 2017. An evaluation of in-vitro potential of novel Lactobacillus paraplantarum KM0 (KX671558) strain isolated from milk. Proc. Indian National Science Academy .2017, 83, 689–699

Shehata M, El Sohaimy S, El-Sahn, M. A and Youssef M, 2016. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. Annals of Agricultural Sciences, 61(1), 65–75. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2016.03.001

Shekh S.L, Dave J.M and Vyas B.R.M, 2016. Characterization of Lactobacillus plantarum strains for functionality, safety and γ-amino butyric acid production. Lwt, 2016. 74: p. 234-241.

Shu-Jun Guo, Chang-Cheng Li, Yu-Ting Feng, Yan-Ru Zhou, Bin Liu, Zhen-Peng Gao, Chun-Feng Guo,

Vanderpool C, Yan F and Polk DB, 2008. Mechanisms of probiotic action implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. Inflammatory Bowel Diseases. 14**:**1585-1596.

Vasiee A, Alizadeh Behbahani B, Yazdi F, Mortazavi SA and Noorbakhsh H, 2018. Diversity and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from horreh, a traditional Iranian fermented food. Probiotics and antimicrobial proteins. 2018 Jun 1;10(2):258-68.

Vasiee A, Falah F, Alizadeh Behbahani B and Tabatabaee-yazdi F, 2020. Probiotic characterization of *Pediococcus* strains isolated from Iranian cereal-dairy fermented product: Interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line Caco-2. Journal of Bioscience and Bioengineering. Volume 130, Issue 5, Pages 471-479.

Vasiee A, Falah F, and Mortazavi S.A, 2022. Evaluation of probiotic potential of autochthonous lactobacilli strains isolated from Zabuli yellow kashk, an Iranian dairy product. Journal of Applied Microbiology, 2022;133:3201–3214.

Yoon H, Hewes D, Salaheen S, Federman C and Biswas D, 2004. Effects of blackberry juice on growth inhibition of food borne pathogens and growth promotion of Lactobacillus. Food Control, 37: 15-20

Zareie Z, Moayedi A, Garavand F, Tabar-Heydar, K, Khomeiri M and Maghsoudlou Y, 2023. Probiotic Properties, Safety Assessment, and Aroma-Generating Attributes of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from Iranian Traditional Cheese. Fermentation 2023, 9, 338. https://doi.org/10.3390/ fermentation9040338.

Zibaei-Rad A, Rahmati-Joneidabad M, Alizadeh Behbahani B and Taki M, 2023. Assessing the protection mechanisms on Enterobacter aerogenes ATCC 13048 by potentially probiotic strain Lacticaseibacillus casei XN18: An experimental and modeling study. Microbial Pathogenesis, 181, Article 106177

Zibaei-Rad A, Rahmati-Joneidabad M, Alizadeh Behbahani B and Taki M, 2024. Probiotic-loaded seed mucilage-based edible coatings for fresh pistachio fruit preservation: an experimental and modeling study. Scientific Reports, 14(1), 509.