

Investigating the probiotic, antioxidant and safety properties of *Lactiplantibacillus plantarum* sps1

Behrooz Alizadeh Behbahani^{1*}✉, Mohammad Hojjati² and Bahareh Goodarzi Shamsabadi³

¹Associate Professor, Professor and 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: 2024-07-18
Accepted: 2024-08-06
Published: 2025-08-05

Keywords:
Probiotic, Cholesterol Absorption, *Lactiplantibacillus plantarum*, Anti-adhesion

ABSTRACT

Background: This comprehensive laboratory study thoroughly investigated the probiotic, antioxidant and safety properties of the *Lactiplantibacillus plantarum* sps1 strain, a strain of great potential isolated from local yogurt

Amis: Considering the emergence of different probiotic characteristics in various genera and species of lactic acid bacteria, this laboratory study evaluated the probiotic, antioxidant and safety properties of the *Lactiplantibacillus plantarum* sps1 strain isolated from local yogurt.

Methods: Probiotic features such as acid resistance (pH 2.5, 3.5, and 4.5), hydrophobicity, bile salt resistance (0.3%, 0.5%, and 0.7%), cholesterol absorption, biogenic amine production, and lack of hemolytic and DNase activity were assessed. The strain's antioxidant capacity (DPPH and ABTS), adhesion potential to Caco-2 cells, anti-adhesion properties, auto aggregation, and coaggregation.

Results: With a decrease in pH levels and an increase in retention time from 0 to 3 hours at the examined pH levels, the number of viable cells of the strain decreased. The strain showed good resistance to all concentrations of bile salts. The hydrophobicity was evaluated at 46.50%, cholesterol absorption at 42.30%, and the inhibition of free radicals DPPH and ABTS at 40.50% and 46.30% respectively. The production of biogenic amine, DNase, and hemolytic activity of the strain were negative. The potential for auto-aggregation and co-aggregation were 38.60% and 22.40% respectively, the adhesion potential to 2-Caco cells was 11%, and the anti-adhesion potential against *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* was 44.20% in competition, 29% in inhibition, and 22.50% in displacement.

Conclusion: Based on the results, the strain possesses acceptable probiotic, antioxidant, and safety potentials. Therefore, it can be stated that this strain is effective in improving health and reducing the incidence of some diseases and has the potential to be used as an effective probiotic.

Extended Abstract

Introduction

Probiotics are defined as microbial supplements that positively impact host health by modulating gut microbiota balance. Their beneficial effects on human health include improving lactose digestion in lactose-intolerant individuals, regulating the immune system, synthesizing B-group vitamins, producing antimicrobial peptides, enhancing immune response, and preventing cell carcinogenesis (Fallah, Mortazavi, Tabatabaei Yazdi, 2018). While most probiotics used in humans belong to the lactic acid bacteria family, not all bacteria in this group qualify as probiotics, as survivability and colonization in the gastrointestinal tract are essential criteria for probiotic selection (Colado, Meriluoto, Salmin, 2007). Lactic acid bacteria, especially

Lactiplantibacillus plantarum, are extensively used in food industry for enhancing flavor, texture, and nutritional properties of various foods such as vegetables, meats, dairy products, and grains. They prolong shelf life by producing organic acids, carbon dioxide, and antimicrobial peptides (Huang *et al.*, 2023). These bacteria also play a crucial role in fermentation processes of foods like dairy products, sausages, pickles, and olives (Sidhu & Nehra, 2019). *Lpb. plantarum*, known for its adaptability and high distribution in diverse environments, is found in fermented dairy products, human and animal digestive systems, as well as fermented meats, fish, and vegetables (Panel & Herman, 2021). Studies highlight its probiotic properties including immune modulation, liver disease reduction, and potential anticancer effects (Garcia-Gonzalez, Battista, Prete, Corsetti, 2021). Recent research focuses on characterizing new probiotic strains like *Lpb. plantarum* sps1 isolated from local yogurt, evaluating its probiotic and antimicrobial potential against various foodborne pathogens (Mokoena, Omatola, Olaniran, 2021).

Materials and Methods

The research process was comprehensive and rigorous. Firstly, the *Lpb. plantarum* sps1

strain was isolated and identified using molecular methods. Subsequently, the strain was evaluated for a wide range of probiotic properties, including acid resistance (pH 2.5, 3.5, and 4.5), 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. 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

Based on the results obtained, the strain exhibits promising probiotic and antimicrobial potential. It demonstrated the highest reduction in strain count after 3 hours at pH 2.5. The strain showed good resistance to all concentrations of bile salts. Its hydrophobicity was 46.5%. It exhibited negative traits for biogenic amine production, DNase activity, and hemolytic activity. Furthermore, it absorbed 42.30% of cholesterol, and its scavenging activities for free radicals DPPH and ABTS were 40.5% and 46.30%, respectively. It also showed auto-aggregation and co-aggregation potentials of 38.60% and 22.40%, respectively. Adhesion potential to Caco-2 cells was 11%, and it displayed competitive inhibition against *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* at 44.20%, inhibition at 29%, and displacement at 22.50%.

Based on the obtained results, the strain has acceptable probiotic, antioxidant, and immune potential. It can be stated that this strain is effective in improving health and reducing disease risks, and ultimately, it can be utilized as an effective probiotic for practical applications.

one essential characteristic of a probiotic is its ability to survive under gastrointestinal conditions, particularly its resistance to acid and bile salts. Additionally, acid tolerance enables the use and survival of these strains in

acidic food products such as yogurt without significant reduction in bacterial population. Probiotic strains, when exposed to the extreme pH of the stomach, may acquire buffering properties through food or other specific molecular carriers. This acid tolerance is also attributed to the synthesis of various polysaccharides, which play a role in protecting the cell membrane (Dardmeh et al., 2023). Noshad et al. (2021) reported that acid resistance is strain-dependent and should be evaluated individually for each bacterium. They also indicated that *Lpb. plantarum* and *Levilactobacillus brevis* exhibit higher resistance to low pH compared to *Pediococcus*. Koshki et al. (2012) found that the best growth of *Lpb. plantarum* isolated from traditional dairy products in Sabzevar was at pH 4, and the strain was capable of growth in the presence of bile salts. Additionally, *Lpb. plantarum* S32E, isolated from traditional Iranian skin cheese, showed the highest survival against simulated gastric and intestinal conditions (Abdoli et al., 2018). Factors such as non-pathogenicity, lack of association with diarrhea-causing bacteria, genetic stability, inability to transfer antibiotic resistance genes, and adhesion capability are crucial for identifying a probiotic bacterium. One key aspect for selecting a strain as a probiotic is determining its adhesion capability to the host mucosa. This not only prevents the adhesion of pathogenic bacteria but also creates an unfavorable environment for their growth by secreting certain substances. It allows the bacteria to occupy target sites on epithelial cells, preventing their attachment and invasion into the gastrointestinal tract (Gabriela et al., 2019). In a study, *Lpb. plantarum* was introduced as a highly adhesive probiotic strain (Handa & Sharma, 2016). *Lpb. plantarum* L33, isolated from Iranian traditional cheese, showed the highest auto-aggregation (49.56%). This study reported the relationship between adhesion capacity and the hydrophobicity of lactic acid bacteria. reactive oxygen species (ROS), such as superoxide ions, hydroxyl radicals, nitric oxide, and peroxynitrite, can react with all cellular

biomolecules and, if accumulated, lead to oxidative stress in the body, causing many chronic inflammatory conditions in the gut (Liu et al., 2018). This antioxidant potential could be attributed to the production of metabolites such as exopolysaccharides (EPS) and various antioxidant enzymes. EPS are long-chained molecules secreted by bacteria into their environment, which have been shown to have antioxidant properties (Fang et al., 2018). Antioxidant compounds produced by probiotic bacteria can scavenge reactive oxygen species and reduce the level of oxidative stress in the host, thereby promoting gut health (Kuda et al., 2019). antioxidant potential of lactic acid bacteria as a free radical scavenger.

DNase, capable of degrading DNA by breaking phosphodiester bonds in the backbone of DNA, may play a role in bacterial growth, enhancing biofilm formation, and immune system modulation, thus acting as a virulence factor (Varela-Ramirez, 2017). Biogenic amines are small molecular compounds that form in protein-rich foods, especially fermented foods. Biogenic amines are formed from free amino acids by microbial decarboxylation. Biogenic amines, especially histamine, are associated with some spoilage microorganisms and can be used as freshness and safety indicators for fermented food products (Sun et al., 2023). Cholesterol, as a vital component of the human body, plays a fundamental role in many processes. However, prolonged high blood cholesterol levels may lead to atherosclerosis and pose a significant risk for cardiovascular diseases. Among the *Lpb. plantarum* strains isolated from goat milk, the highest cholesterol reduction was observed in *Lpb. plantarum* Lpb02 with 68%, followed by *Lpb. plantarum* Lpb01 with the second highest reduction at 51%, while commercial strain *Lpb. plantarum* ATCC 8014 showed a reduction capability of 51% (Islam et al., 2022). The food chain is considered one of the main pathways for the transfer of antibiotic-resistant bacteria between animal and human populations. Fermented dairy products,

especially those not subjected to heat treatment before consumption, are identified as a route for transferring antibiotic-resistant bacteria (Mathur & Singh, 2005). In this study, the resistance of *Lpb. plantarum* sps1 strain to eight common antibiotics was evaluated (Table 2). This strain was sensitive to six antibiotics, resistant to Imipenem, and showed intermediate sensitivity to Gentamicin. Evidence suggests that *Lactobacillus* species are generally sensitive to antibiotics such as erythromycin, chloramphenicol, and tetracycline (Alizadeh Behbahani et al., 2023). Anti-adhesive properties were evaluated through various adhesion inhibition assays, including competitive, inhibitory, and displacement tests against *S. typhimurium*. *Lactobacillus* strains such as *Lpb. plantarum* TW57-4 exhibited the highest activity against *P. aeruginosa*, with strains *Lpb. plantarum* 5H1, *Lpb. plantarum* 5 L1, and *Lcb. rhamnosus* GG showing a greater reduction (56%–73%) in *Salmonella* adhesion (Vasiee, Falah, Mortazavi, 2022; Luz et al., 2021). The displacement capability of strains may be due to competition for common adhesion receptors, production of anti-adhesive compounds, and secretion of antimicrobial agents. Various mechanisms are involved in bacterial anti-adhesive processes, including chemical and physical interactions between bacterial and host or environmental surfaces. Correlation between anti-adhesive results and adhesion may indicate similar mechanisms in both phenomena; however, other studies have reported no correlation between anti-adhesive and adhesion results (Haghshenas et al., 2016).

Conclusion

The strain *Lpb. plantarum* SPS1 exhibits potential for survival in acidic conditions across various pH levels. It also demonstrates resilience against different concentrations of bile salts, which is advantageous for its survival in environments like the intestine. The strain shows adequate hydrophobicity and auto-aggregation, facilitating interactions with other cells and adherence to different surfaces. These characteristics position it as an effective probiotic that can prevent pathogenic bacteria

from adhering to epithelial cells. The strain's ability to produce biogenic amines, lack of DNase activity, absence of hemolytic activity, and antioxidant activity further endorse its potential health benefits. Ultimately, *Lpb. plantarum* SPS1 proves to be a valuable probiotic strain for improving health and reducing disease risks, making it a promising candidate for practical applications.

بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی، آنتی اکسیدانی و ایمنی سویه *Lactiplantibacillus plantarum* sps1

بهروز علیزاده بهبهانی^۱✉، محمد حجتی^۲، بهاره گودرزی شمس آبادی^۳

به ترتیب^۱ دانشیار،^۲ استاد و^۳ دانشجوی دکتری گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

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

چکیده

مشخصات مقاله

زمینه مطالعاتی: در این پژوهش آزمایشگاهی ویژگی‌های پروبیوتیکی، آنتی اکسیدانی و ایمنی سویه *Lactiplantibacillus plantarum* sps1 جداسازی شده از ماست محلی بررسی شد.

هدف: با توجه به بروز ویژگی‌های پروبیوتیکی متفاوت در جنس و گونه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک در این پژوهش، ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی، آنتی اکسیدانی و ایمنی سویه *Lactiplantibacillus plantarum* sps1 جداسازی شده از ماست محلی مورد بررسی قرار گرفت. روش کار: ویژگی‌های پروبیوتیکی از قبیل مقاومت به اسید (pH ۲/۵، ۳/۵ و ۴/۵)، خاصیت هیدروفوبیسیته، مقاومت به صفرا (۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷)، جذب کلسترول، تولید آمین بیوژنیک، حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها، عدم فعالیت همولیتیک و DNase بررسی شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی سویه (DPPH و ABTS)، پتانسیل چسبندگی به سلول Caco-۲، ضد چسبندگی، تجمع خودکار و انباشتگی نیز ارزیابی گردید.

نتایج: با کاهش میزان pH و همچنین افزایش زمان ماندگاری از صفر تا ۳ ساعت در pHهای مورد بررسی تعداد سلول‌های زنده سویه کاهش یافت. سویه در تمامی غلظت‌های نمک‌های صفراوی مقاومت خوبی از خود نشان داد. خاصیت هیدروفوبی، ۴۶/۵۰ درصد، میزان جذب کلسترول ۴۲/۳۰ و میزان مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS به ترتیب ۴۰/۵۰ و ۴۶/۳۰ درصد ارزیابی گردید. نتایج حاصل از بررسی تولید آمین بیوژنیک، DNase و فعالیت همولیتیک سویه منفی بود. پتانسیل تجمع خودکار و انباشتگی به ترتیب ۳۸/۶۰ و ۲۲/۴۰ درصد، پتانسیل چسبندگی به سلول Caco-۲، ۱۱ و پتانسیل ضد چسبندگی در برابر *Salmonella enterica* serovar Typhimurium در رقابت ۴۴/۲۰، در مهار ۲۹ و در جابه‌جایی ۲۲/۵۰ درصد به دست آمد.

نتیجه‌گیری نهایی: بر اساس نتایج، سویه دارای پتانسیل پروبیوتیکی، آنتی اکسیدانی و ایمنی قابل قبولی است. بنابراین می‌توان بیان کرد این سویه در بهبود سلامتی و کاهش بروز برخی بیماری‌ها موثر است و سویه پتانسیل استفاده به عنوان پروبیوتیکی موثر را دارا است.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، جذب کلسترول، *Lactiplantibacillus plantarum*، ضد چسبندگی.

نوع مقاله:

علمی پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۳/۴/۲۸

پذیرش: ۱۴۰۳/۵/۱۶

انتشار: ۱۴۰۴/۵/۱۵

کلید واژگان:

پروبیوتیک، جذب

کلسترول،

Lactiplantibacillus plantarum

ضد چسبندگی.

مقدمه

امروزه پروبیوتیک‌ها مکمل‌های میکروبی تعریف می‌شوند که با اصلاح تعادل فلور میکروبی روده تاثیر مثبتی در میزبان ایجاد می‌کنند. اثر پروبیوتیک‌ها بر سلامتی انسان عبارت است از: بهبود در قابلیت هضم شیر در افراد مبتلا به عدم تحمل لاکتوز، تنظیم سیستم ایمنی بدن، تولید ویتامین‌های گروه B، تولید پپتیدهای ضد میکروبی، افزایش ایمنی بدن و جلوگیری از سرطانی شدن سلول‌ها (فلاح و همکاران، ۲۰۱۸؛ بهبهانی و همکاران، ۲۰۲۴؛ اچرش و همکاران، ۲۰۲۴). اگرچه بیشتر پروبیوتیک‌های مورد استفاده در انسان از خانواده باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌باشند، اما این امر نباید منجر به این اشتباه گردد که هر باکتری از این گروه یک پروبیوتیک است، چرا که توانایی بقاء و کلونیزاسیون در سیستم گوارشی شرط لازم در انتخاب باکتری پروبیوتیک می‌باشد. اثرات مفید و ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتری‌های اسیدلاکتیک درحد سویه متفاوت بوده و حتی در سویه‌های یک گونه ویژگی‌های عملکردی متفاوت دیده می‌شود (کولادو و همکاران، ۲۰۰۷؛ فلاح و همکاران، ۲۰۱۹؛ وسیعی و همکاران، ۲۰۱۸؛ زیبایی‌راد و همکاران، ۲۰۲۳؛ برزگر و همکاران، ۲۰۲۱؛ برزگر و همکاران، ۲۰۲۳). امروزه استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک در صنعت غذا، اهمیت فزاینده‌ای پیدا کرده‌اند و مطالعه‌های بسیاری پیرامون استفاده احتمالی از گونه‌های تولید کننده باکتریوسین به عنوان جایگزین‌های مواد نگهدارنده شیمیایی در مواد غذایی تمرکز کرده‌اند (ترفه، ۲۰۱۶؛ روحی و همکاران، ۲۰۲۴؛ فلاح و همکاران، ۲۰۲۱؛ شیرانی و همکاران، ۲۰۲۲). علاوه بر این، باکتری‌های اسیدلاکتیک، به طور گسترده برای بهبود طعم، بافت و خواص تغذیه‌ای انواع مختلف مواد غذایی، از جمله سبزی‌ها، گوشت، محصولات لبنی و غلات مورد استفاده قرار گرفته‌اند و می‌توانند با تولید اسیدهای آلی، دی‌اکسید کربن و پپتیدهای ضد میکروبی، عمر مفید این محصولات را افزایش دهند (هوانگ و همکاران، ۲۰۲۳؛ وسیعی و همکاران، ۲۰۱۸؛ علیزاده بهبهانی و همکاران، ۲۰۲۳؛ علیزاده بهبهانی و همکاران، ۲۰۲۴). باکتری‌های اسیدلاکتیک، به دلیل توانایی تخمیر، در تولید بسیاری از مواد غذایی، مانند محصولات لبنی، سوسیس، خیار

شور و زیتون مورد استفاده قرار می‌گیرند (سیدو و نهرا، ۲۰۱۹؛ وسیعی و همکاران، ۲۰۱۴). باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌طور معمول، یا به‌صورت کشت‌های استارتر، در راستای ایجاد تغییرات بیوشیمیایی اصلی در تخمیر مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند و یا به عنوان کشت‌های غیراستارتر، که معمولاً از میکروبیوتای بومی ماتریکس غذایی به دست می‌آیند و در جنبه‌های ثانویه به بهبود ویژگی‌های ارگانولپتیک محصول نهایی کمک می‌کنند. پتانسیل ضد میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک غیراستارتر جدا شده از مواد غذایی تخمیر شده توسط مطالعه‌های علمی تایید شده است و شامل تولید اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین‌ها می‌باشد (تورت و همکاران، ۲۰۱۸؛ مدینا-پاراداس و همکاران، ۲۰۱۷؛ وسیعی و همکاران، ۲۰۱۹). در سال‌های اخیر، بسیاری از پژوهشگران ثابت کرده‌اند که باکتری‌های اسیدلاکتیک توانایی خنثی‌سازی چندین گونه میکروبی نامطلوب، از جمله گونه‌های *Clostridium*، *Enterococcus faecalis* و *Listeria monocytogenes* را دارند (موکنا و همکاران ۲۰۲۱).

Lactiplantibacillus plantarum باکتری از گروه اسیدلاکتیک‌ها است که به عنوان پروتکنولوژیک در بخش غذایی، در تخمیر مواد غذایی و در طراحی کشت‌های محافظتی مورد استفاده قرار گرفته و استفاده از آن سابقه‌ای طولانی دارد (بوردیجن و همکاران، ۲۰۱۹). از آنجایی که این گونه توانایی سازگاری و توزیع بالا در محیط‌های متنوع را دارا است، این باکتری به راحتی در محصولات لبنی، دستگاه گوارش انسان و حیوانات، و در گوشت، ماهی و سبزی‌ها تخمیر شده یافت می‌شود (پنل و همکاران ۲۰۲۱؛ فلاح و همکاران، ۲۰۲۱). تاکنون، اکثر مطالعه‌ها بر ویژگی‌های ایمنی و خواص پروبیوتیکی سویه‌های *Lpb. plantarum* تأکید کرده‌اند (ماو و همکاران، ۲۰۲۱). همچنین برخی از ویژگی‌های *Lpb. plantarum* در جهت استفاده به عنوان زیست‌پزشکی، مانند توانایی آن در تنظیم میکروبیوتای روده و کاهش بیماری‌های کبدی و پتانسیل ضدسرطانی آن در مطالعه‌های اخیر مورد بررسی قرار گرفته است (گارسیا گونزالز و همکاران، ۲۰۲۱؛ علیزاده و همکاران، ۲۰۲۰؛ زیبایی راد و همکاران، ۲۰۲۴). با

توجه به اینکه بروز ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک کاملاً وابسته به جنس و سویه است و همچنین اهمیت بالای توصیف سویه‌های جدید پروبیوتیکی، هدف از این پژوهش آزمایشگاهی بررسی پتانسیل پروبیوتیکی آنتی‌اکسیدانی و ایمنی سویه *Lpb. plantarum* sps1 جدا شده از ماست محلی بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی سویه *Lpb. plantarum* sps1 به روش ملکولی

این پژوهش آزمایشگاهی در سال ۱۴۰۲ 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. سویه *Lpb. plantarum* sps1 مطابق با مطالعه سبکتکین ریزی و همکاران (۲۰۲۱)، جداسازی شد. نمونه ماست به صورت تصادفی از یک بازار محلی در شهرستان بهبهان جمع‌آوری شدند و تحت شرایط سردخانه‌ای به آزمایشگاه منتقل شدند. به ۵ گرم نمونه پیتون واتر (۰/۱ درصد؛ ۴۵ میلی‌لیتر) اضافه شده و توسط هموژنایزر (Seaward، آلمان) هموژنیزه شدند. پس از آن رقت‌سازی به صورت سریالی (10^{-1} – 10^{-6}) انجام شده و کشت روی محیط کشت MRS آگار انجام شد. سویه از محیط کشت جدا شد و به دنبال آن تحت آزمایش‌های رنگ‌آمیزی گرم و کاتالاز قرار گرفت. پس از آن، DNA ژنومی از سویه با استفاده از کیت جداسازی DNA ژنومی VI استخراج و به مدت یک شب در MRS مایع کشت داده شد. پرایمرهای عمومی مورد استفاده برای بیان ژن rRNA ۱۶S شامل ۲۵FYM (5'-AGAGTTTGTGCTCAG-3') و ۱۴۹۲R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') بودند. واکنش زنجیره ای پلیمراز^۲ در کیت PCR در حجم نهایی ۲۵/۱۵ میکرولیتر انجام گرفت. میکروتیوب حاوی PCR داخل دستگاه

ترموسایکلر^۳ قرار گرفت این برنامه دمایی شامل فعالسازی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ سانتی‌گراد، (یک سیکل)، گسترش که خود شامل سه مرحله واسرشته سازی^۴ (۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد)، اتصال پرایمر (۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد) و توسعه (۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد)، ۳۵ سیکل و گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، (یک سیکل). الکتروفورز در ولتاژ ۹۵ ولت و زمان ۴۵ دقیقه انجام پذیرفت. سپس ژل در دستگاه ژل داک^۵ رویت شد. نتایج نشان داد که ایزوله با خواص کاتالاز منفی و گرم مثبت با کد دسترسی OP168130 و میزان شباهت ۹۸ درصد متعلق به سویه *Lpb. plantarum* SPS1 است.

آزمون مقاومت به اسید و نمک‌های صفراوی

آزمون مقاومت به اسید مطابق با روش برزگر و همکاران (۲۰۲۱)، انجام شد. ابتدا سویه *Lpb. plantarum* SPS1 در محیط کشت MRS مایع (مرک، آلمان) به میزان ۵ میلی‌لیتر در هر لیتر تحت شرایط بی‌هوازی کشت شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت، ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی به لوله‌های فالتون استریل اضافه شد. برای جدا کردن سلول‌های باکتری از محیط کشت، از سانتریفیوژ یخچال‌دار (Hermle، آلمان) با سرعت ۶۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. سوسپانسیون میکروبی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر به جذب نوری ۰/۶ رسید. ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به درون میکروتیوب حاوی ۴۵۰ میکرولیتر محلول نمک فسفات بافری ریخته شده که به عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته خواهد شد. سپس نمونه کنترل به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه‌گذاری شد. از HCl (۰/۱ نرمال)، توسط محلول نمک فسفات بافری، اسیدهایی با pHهای ۲/۵، ۳/۵ و ۴/۵ تهیه شد. در میکروتیوب‌های حاوی ۴۵۰ میکرولیتر نمک فسفات بافر استریل با pHهای مورد نظر میزان ۵۰ میکرولیتر

⁴ Denaturation

⁵ Gel documentation system

¹ De Man-Rogosa-Sharpe

² Polymerase chain reaction

³ Thermocycler

آلی جابه‌جا شود. پس از انتقال باکتری بین دو فاز، مجدداً جذب آن‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (A_2). هیدروفوبیستی سطحی سلول‌ها با استفاده از معادله ۱، محاسبه گردید.

$$\text{hydrophobicity}\% = \left[\frac{A_1 - A_2}{A_1} \right] \times 100 \quad (\text{معادله ۱})$$

ظرفیت تجمع خودکار^۱ و انباشتگی سلول^۲

ارزیابی ظرفیت تجمع خودکار و انباشتگی سلول سویه *Lpb. plantarum* SPS1 مطابق با روش زارعی و همکاران (۲۰۲۳)، انجام شد. در ارزیابی ظرفیت تجمع خودکار، ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد و جذب آن در ۶۰۰ نانومتر (A_i) اندازه‌گیری شد. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب مایع رویی در همان طول موج (A_{2h}) تعیین شد.

در ارزیابی انباشتگی سلول نیز پس از انکوباسیون در صفر و ۵ ساعت، مقادیر جذب سویه پروبیوتیک (A_x)، سویه بیماری‌زا (A_y) و مخلوط سویه‌های پروبیوتیک و بیماری‌زا (A_{x+y}) در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد تا هم‌تجمعی *Salmonella enterica* و *Lpb. plantarum* SPS1 و *serovar Typhimurium* ارزیابی شود. ضریب تجمع خودکار با استفاده از معادله ۲، و انباشتگی سلول با استفاده از معادله ۳، محاسبه شد.

$$\text{Auto-aggregation \%} = \left[\frac{A_i - A_{2h}}{A_i} \right] \times 100 \quad (\text{معادله ۲})$$

(معادله ۳)

$$\text{Co-aggregation \%} = [(A_x + A_y)/2 - A_{x+y}] / [(A_x + A_y)/2] \times 100$$

پتانسیل چسبندگی به سلول Caco-2^۳

توانایی چسبندگی سویه، مطابق با روش وسیعی و همکاران (۲۰۲۰)، ارزیابی شد. سلول‌های Caco-2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در رطوبت ثابت با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن با استفاده از محیط DMEM^۴ حاوی ۱٪ پنی‌سیلین -

از سوسپانسیون میکروبی ریخته شد و همراه با نمونه کنترل انکوبه‌گذاری شد. پس از گذشت ۳ ساعت، برای نمونه‌ها تا ۹-۱۰ رقت‌سازی انجام شد. در انتها از رقت‌های مورد نظر به میزان ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون در پلیت‌های حاوی MRS آگار کشت خطی داده شد و ۲۴ ساعت در جاربیه‌های و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه‌گذاری شد و پس از آن تعداد باکتری *Lpb. plantarum* SPS1 رشد یافته شمارش شد. آزمون بررسی مقاومت صفرا سویه مطابق با روش مومن‌زاده و همکاران (۲۰۲۰)، انجام شد. در این روش به منظور ارزیابی مقاومت به صفرا سویه *Lpb. plantarum* SPS1، ابتدا سویه مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده بر محیط‌های MRS آگار حاوی ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ درصد از نمک صفراوی کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. از پلیت فاقد نمک صفراوی به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

هیدروفوبیستی سطحی سلول

سطح هیدروفوبیستی سلول‌های ایزوله با استفاده از روش علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۳)، شد. افزایش هیدروفوبیستی باکتری‌های اسیدلاکتیک از طریق چسبندگی به n-هگزادکان بررسی شد. ابتدا سویه مورد نظر در محیط MRS آگار رشد داده شد. پس از فعال‌سازی سویه در در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت، در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. سلول‌های باکتریایی حاصل با محلول نمک فسفات بافری استریل و سرد شسته شد. سلول‌های شسته شده به صورت سوسپانسیون در محلول آبی قرار می‌گیرند و جذب آن‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود (A_1). ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با ۲ میلی‌لیتر n-هگزادکان مخلوط شده و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای محیط (معمولاً ۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت تا باکتری بین فاز آبی و فاز

³ Adhesion capacity

⁴ Dulbecco's modified eagle medium

¹ Auto-aggregation capacity

² Co-aggregation

MRS آگار گزارش شد. از معادله ۴ جهت ارزیابی ظرفیت چسبندگی سویه استفاده شد.

(معادله ۴)

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

خاصیت ضد چسبندگی سلول^۲

به منظور ارزیابی رقابت^۳، بازداري^۴ و جایگزینی^۵ به منظور بررسی پتانسیل ضد چسبندگی باکتری *S. Typhimurium* بر اساس روش موسی نژاد و همکاران (۲۰۲۳)، چاهک‌ها با مقادیر مساوی از هر دو باکتری بارگذاری شدند و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط محیطی ۵ به ۹۵ درصد از CO₂ و رطوبت ثابت، گرمخانه‌گذاری شدند (موسی نژاد و همکاران، ۲۰۲۳). برای شستشوی باکتری‌های غیر متصل، از بافر فسفات استریل استفاده شد، در حالی که باکتری‌های متصل شده با استفاده از ۰.۵٪ Triton X-100 از سطح جدا شدند. سویه پاتوژن با استفاده از محیط انتخابی شناسایی شد و رقابت چسبندگی بین دو گونه بر اساس معادله ۵ محاسبه شد.

(معادله ۵)

$$\text{Competition \%} = \left(\frac{\text{Adhered } S. Typhimurium \text{ with } Lpb. plantarum SPS1}{\text{Bounded } S. Typhimurium \text{ with } Lpb. plantarum SPS1} \right) \times 100$$

محاسبه شد. در آزمایش جایگزینی، توانایی *Lpb. plantarum* SPS1 برای جایگزینی سویه بیماری‌زا در سلول‌های روده مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش دقیقاً همانند آزمایش قبلی انجام شد، با این تفاوت که ابتدا *S. Typhimurium* اضافه شد و سپس پس از ۱ ساعت انکوباسیون، *Lpb. plantarum* SPS1 اضافه شد. با مقایسه *S. Typhimurium* متصل شده با نمونه‌هایی که *Lpb. plantarum* SPS1 نداشتند، میزان درصد جایگزینی محاسبه شد.

(معادله ۶)

استرپتومایسین و ۱۰٪ FBS^۱ غیرفعال شده با حرارت کشت داده شدند. سلول‌های Caco-2 زمانی که ۸۰٪ همگرایی داشتند، با ۱٪ تریپسین EDTA-تریپسینه شده و سپس به صفحات بافتی ۶-چاهی با چگالی ۳۰۰۰۰ سلول بر سانتی‌متر مربع منتقل شدند. پس از تشکیل یک لایه تک‌سلولی تمایز یافته، سلول‌ها انکوبه و محیط کشت به‌طور منظم تازه شد. محیط کشت قدیمی، به‌ویژه پنی‌سیلین-استرپتومایسین، سپس با استفاده از بافر فسفات استریل از چاهک‌ها برداشته شد. کشت باکتریایی شبانه سانتریفیوژ شده (۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) و رسوب دو بار با بافر فسفات سرد شسته شد. سوسپانسیون باکتری به لایه تک‌سلولی همگرای Caco-2 به صورت سوسپانسیون در DMEM با غلظت ۱۰^۸ باکتری در میلی‌لیتر اضافه شد. پس از انکوباسیون ۱ ساعت، ۳۷ درجه سانتی‌گراد، باکتری‌های غیر متصل با تخلیه متوالی و شستشوی چاه‌ها با بافر فسفات از صفحات برداشته شدند. سلول‌های Caco-2 با استفاده از یک میلی‌لیتر Triton X-100 پس از انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه لیز شدند و شمارش باکتری‌ها بر روی

همچنین برای ارزیابی توانایی سویه *Lpb. plantarum* SPS1 در جلوگیری از چسبندگی *S. Typhimurium* به سلول‌های روده با استفاده از آزمایش مهار مورد بررسی قرار گرفت. یک چاهک حاوی سلول‌های Caco-2 و *Lpb. plantarum* SPS1 ابتدا تحت فشار CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شد، سپس باکتری‌های آزاد با شستشوی چاهک با بافر فسفات حذف شدند و *S. Typhimurium* به چاهک اضافه شد. پس از انکوباسیون به مدت ۱ ساعت، *S. Typhimurium* غیر متصل حذف شد و سلول‌های Caco-2 با استفاده از Triton X-100 جدا شدند. شمارش باکتری‌ها انجام شد و اثرات مهار به کمک معادله ۶

⁴Inhibition

⁵ Displacement

¹ Fetal bovine serum

² Anti-adhesion assays

³Competition

$$\text{Inhibition} = \left(1 - \frac{S. Typhimurium \text{ Adhesion in the presence of } Lpb. plantarum \text{ SPS1}}{S. Typhimurium \text{ Adhesion in the absence of } Lpb. plantarum \text{ SPS1}}\right) \times 100$$

تغییر رنگ در اطراف کلنی‌ها (بدون رنگ). فعالیت DNase با اضافه کردن ۵ میکرولیتر از کشت مایع روی پلیت‌های DNase آگار تعیین شد؛ پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، پلیت‌ها با ناحیه شفاف و صورتی در اطراف کلونی‌ها، DNase مثبت گزارش شد (وسیعی و همکاران، ۲۰۲۰).

تولید آمین بیوژنیک^۶

قابلیت تشکیل تیرامین، هیستامین، پوتری سین و کاداورین توسط سویه *Lpb. plantarum* SPS1 با افزودن ۱٪ (w/v) از پیش‌ساز هر آمینو اسید (ال-هیستیدین مونوهیدروکلراید، نمک تیروزین دی سدیم، ال-اورنیتین، مونوهیدروکلراید و ال-لیزین مونوهیدروکلراید)، مورد ارزیابی قرار گرفت؛ پیش‌سازها به پلیت‌های MRS آگار با ۰/۰۶٪ بروموکروزول بنفش اضافه شدند. ظاهر شدن رنگ بنفش در پلیت‌ها پس از ۲ تا ۵ روز انکوباسیون، نشان‌دهنده واکنش‌های مثبت بود (نژاد و همکاران، ۲۰۲۰).

آزمون قابلیت حذف کلسترو

توانایی *Lpb. plantarum* SPS1 در جذب کلسترو با استفاده از روش علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۳)، بررسی شد. به طور خلاصه، به محیط کشت MRS، polyoxyethanyl-cholesteryl sebacate (فرم محلول کلسترو) و Oxgall با غلظت ۰/۳٪ اضافه شدند. این اقدام منجر به فراهم شدن ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کلسترو در محیط شد. کشت (۱٪) تلقیح (T) و سپس در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی انکوبه شد. شاهد مایع استریل بود که تلقیح نشده (C) بود. در نهایت میزان کلسترو باقی‌مانده در محیط از معادله ۸ به دست آمد.

(رابطه ۸)

$$\text{Cholesterol assimilation}\% = \frac{C-T}{C} \times 100$$

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط مهار رادیکال DPPH^۱ و ABTS^۲

فعالیت جذب رادیکال آزاد DPPH مطابق با روش کیم و همکاران (۲۰۲۰)، با برخی تغییرات ارزیابی شد. برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سویه، ۲ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (۰/۱۴ میلی‌مولار) و ۲ میلی‌لیتر نمونه باکتریایی مخلوط شدند. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس جذب در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. در بررسی قابلیت مهار رادیکال آزاد ABTS نیز ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه و ۶۰۰ میکرولیتر از محلول ABTS مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. میزان جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد (علیزاده بهبهانی و همکاران، ۲۰۲۳). فعالیت مهار رادیکال در هردو روش با استفاده از معادله ۷ به دست آمد.

(معادله ۷)

$$\text{Scavenging Activity \%} = \left(1 - \frac{A_{\text{control}}}{A_{\text{sample}}}\right) \times 100$$

عدم فعالیت همولیتیک^۳ و دئوکسی ریبونوکلاز^۴

برای ارزیابی فعالیت همولیتیک، از روش پینو و همکاران (۲۰۲۰)، استفاده شد. کشت‌های سلولی به مدت ۲۴ ساعت بر محیط کشت تریپتیک سوی آگار^۵ (مرک آلمان با ۷ درصد (v/v) خون گوسفند قرار داده شدند. پس از انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، فعالیت همولیتیک به صورت بصری ارزیابی شد. کلنی‌ها برای تشکیل یا عدم تشکیل نواحی شفاف، هاله‌های سبز و یا ظاهر بدون رنگ در اطراف آن‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس مشاهدات، فعالیت همولیتیک باکتری بر این اساس دسته‌بندی شد: (۱) β-همولیز، نواحی شفاف در اطراف کلنی‌ها؛ (۲) α-همولیز، هاله‌های سبز در اطراف کلنی‌ها؛ و (۳) γ-همولیز، بدون

^۴ DNase

^۵ Tryptic soy agar
Biogenic amine^۱

^۱ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

^۲ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

^۳ Hemolytic activity

است (دردمه و همکاران، ۲۰۲۳). نتایج ارزیابی مقاومت ایزوله‌های اسید لاکتیک نسبت به شرایط اسیدی در شکل ۱، نشان داده شده است.

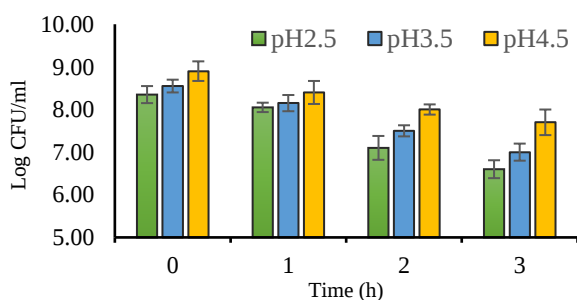


Fig. 1. The capacity *Lactiplantibacillus plantarum* SPS1 to endure in an acidic pH environment

بقای *Lpb. plantarum* sps1 به طور قابل توجهی تحت تاثیر pH و زمان قرار گرفتن در معرض pH بود. با کاهش pH از ۴/۵ به ۲/۵، کاهش قابل توجهی در تعداد سلول‌های زنده مشاهده شد و از ۷/۷۰ به ۶/۶۰ Log CFU/mL کاهش یافت. علاوه بر این، تعداد سلول‌های زنده سویه در pH ۲/۵ با افزایش زمان از صفر به ۳ ساعت از ۸/۳۵ به ۶/۶۰ Log CFU/mL کاهش یافت. نتایج بررسی مقاومت به نمک صفراوی در جدول ۱، آورده شده است. همچنین سویه *Lpb. plantarum* sps1 در غلظت‌های نمک‌های صفراوی مورد بررسی در این مطالعه (۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷)، مقاومت خوبی از خود نشان داد. نوشاد و همکاران (۲۰۲۱)، در پژوهش خود 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 *Lpb. plantarum* و *Levilactobacillus brevis* نسبت به پدیوکوکوس مقاومت بالاتری نسبت به pH پایین دارند. در مطالعه کوشکی و همکاران (۲۰۱۲)، بهترین رشد *Lpb. Plantarum* جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی سبزوار، در pH ۴ بوده و سویه توانایی رشد در حضور نمک‌های صفراوی را دارا بود. همچنین *Lpb. Plantarum* S32E، جداسازی شده از پنیر سنتی پویتی ایرانی بیشترین زنده‌مانی را در برابر شرایط شبیه‌سازی شده‌ی معده و روده

آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها

برای ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه *Lpb. plantarum* SPS1 از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استفاده شد. ابتدا، یک سوسپانسیون باکتریایی حاوی 10^6 – 10^7 سلول در میلی‌لیتر تهیه شد. حجمی معادل ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون با ۴ میلی‌لیتر آگار نرم (۰/۸٪ w/v) مخلوط و بر روی یک پلیت MRS آگار با حجم ۱۵ میلی‌لیتر پخش شد. سپس، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بر محیط کشت قرار گرفتند که شامل محدوده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌های رایج مانند جنتامایسین (۱۰ μg/mL)، کلرامفنیکل (۳۰ μg/mL)، پنسیلین (۱۰ μg/mL)، ونکومایسین (۳۰ μg/mL)، نیتروفورازون (۳۰ μg/mL)، نالیدیکسیک (۳۰ μg/mL)، ایمپینیم (۱۰ μg/mL) و سیپروفلوکساسین (۵ μg/mL) بودند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، قطر نواحی مهار در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک اندازه‌گیری شد (زارعی و همکاران، ۲۰۲۳).

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 و نمک‌های صفراوی

مقاومت به اسید و نمک‌های صفراوی

از ویژگی‌های لازم برای یک پروبیوتیک توانایی بقاء در شرایط دستگاه گوارش با مقاومت به اسید و صفرا است. همچنین تحمل اسید امکان استفاده و بقای این سویه‌ها در محصولات غذایی اسیدی مانند ماست را بدون کاهش قابل توجه جمعیت باکتری فراهم می‌کند. سویه‌های پروبیوتیکی زمانی که در معرض pH شدید معده قرار می‌گیرند، توسط غذا و یا سایر حامل‌های مولکولی خاصیت بافری پیدا می‌کنند. از سوی دیگر این توانایی تحمل اسید به سنتز ترکیبات پلی‌ساکاریدی مختلف که در حفاظت از غشای سلولی نقش دارند، نسبت داده شده

کلونیزاسیون آن‌ها می‌شود. ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی سطح سلول مانند هیدروفوبیسیته می‌تواند بر تجمع و اتصال باکتری‌ها به سطوح مختلف تاثیر بگذارد (واسچی و همکاران، ۲۰۱۹). در پژوهشی سویه *Lpb. plantarum* به عنوان پروبیوتیکی با خاصیت چسبندگی بالا معرفی شد (هاندا و شارما، ۲۰۱۶). *Lpb. plantarum* L33 جداسازی شده از پنیر سنتی ایرانی دارای بالاترین تجمع خودکار (۴۹/۵۶٪) بود. در این پژوهش رابطه بین ظرفیت چسبندگی و هیدروفوبیسیته باکتری‌های اسید لاکتیک گزارش شده است. در این مطالعه *Lpb. plantarum* L33، *E. faecium* L13 و *Lpb. pentosus* L11 با قابلیت چسبندگی سلولی قابل توجهی نسبت به *S. Typhimurium* و *L. monocytogenes* نشان دادند (زارعی و همکاران، ۲۰۲۳). نتایج مربوط به هیدروفوبیسیته سطح سلول، ظرفیت تجمع خودکار، انباشتگی سلول و پتانسیل چسبندگی به سلول Caco-2، سویه *Lpb. plantarum* sps1 در شکل ۲، ارائه شده است.

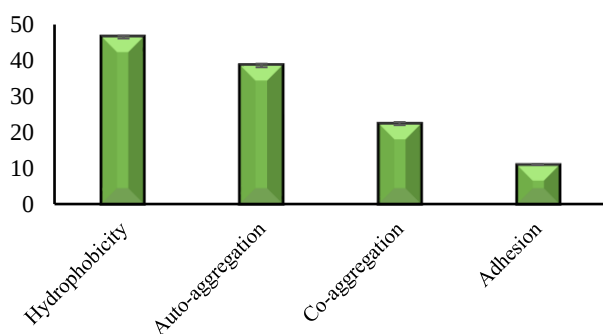


Fig. 2. Hydrophobicity, Auto-aggregation, co-aggregation and adhesion capacity ability of *Lactiplantibacillus plantarum* SPS1

در مطالعات مشابه میزان ظرفیت چسبندگی *Lpb. plantarum* ATCC14917، *Lpb. plantarum* L15 و *Lpb. plantarum* L15 به ترتیب ۱۲/۲٪ و ۳۰/۳۲٪ گزارش شد (عزیزاده بهبهانی و همکاران، ۲۰۱۹؛ دردمه ۲۰۲۳). این ویژگی در جلوگیری از چسبیدن پاتوژنها به مخاط روده مهم است. در مطالعات دیگر بیشترین میزان هیدروفوبیسیته *Lpb. plantarum* A44 و *Lpb. plantarum* L15 به ترتیب ۸۴/۵٪ و ۵۴٪ ارزیابی شد (عزیزاده بهبهانی و همکاران، ۲۰۱۹؛ وسیعی و همکاران،

نشان داد (عبدلی و همکاران، ۲۰۱۸). نوری و همکاران (۲۰۲۱)، گزارش کردند *Lpb. plantarum* توانایی رشد در محیط کشت حاوی ۰/۳٪ و ۰/۵٪ نمک صفراوی را دارا می‌باشد. نتایج مطالعه عیسوند حیدری و همکاران (۲۰۲۱)، نشان داد که باکتری *Lpb. plantarum* در pHهای ۳/۵ و ۵ به ترتیب ۸۵/۳۵ و ۶۹/۹۶ درصد قابلیت زنده‌مانی داشت. همچنین در این مطالعه باکتری *Lpb. plantarum* در تمامی غلظتهای نمک صفراوی مورد آزمایش قادر به رشد بود. باکتری پروبیوتیک مقاومت خود را در برابر نمک صفراوی از طریق خشتی کردن اثرات نمک صفراوی و کاهش سطح کلسترول خون در بیماران با کلسترول بالا که نتیجه تولید آنزیم‌های آبکافت کننده نمک صفراوی توسط باکتری پروبیوتیک است، به دست می‌آورد.

Table 1. The effect of different concentrations of bile salt on the viability of *Lactiplantibacillus plantarum* SPS1

Survivability	Bile salt (%)			
	0.3%	0.5%	0.7%	Control
	Growth	Growth	Growth	Growth

هیدروفوبیسیته سطحی سلول، ظرفیت تجمع خودکار، انباشتگی سلول و پتانسیل چسبندگی به سلول از عوامل موثر برای تشخیص یک باکتری پروبیوتیک می‌تواند به غیربیماری‌زایی، عدم ارتباط با باکتری‌های مولد اسهال، توانایی در حفظ و پایداری ژنتیکی و عدم توانایی در انتقال ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی و قابلیت چسبندگی اشاره نمود. یکی از مهمترین اقدام جهت انتخاب یک سویه به عنوان پروبیوتیک تعیین قابلیت چسبندگی آن سویه به مخاط میزبان می‌باشد، تا علاوه بر پیشگیری از چسبندگی باکتری‌های بیماری‌زا، با ترشح برخی مواد بتواند محیط را برای رشد آن‌ها نامساعد سازد و بتواند با اتصال به سلول‌های اپیتلیال، مکان‌های هدف باکتری‌های پاتوژن را اشغال کرده و مانع از اتصال و تهاجم آن‌ها به دستگاه گوارش شوند (گابریلا و همکاران، ۲۰۱۹). ظرفیت تجمع خودکار در گونه‌های پروبیوتیکی برای اتصال به سلول‌های اپیتلیال ضروری است، همچنین توانایی آن‌ها برای ایجاد انباشتگی سلول با دیگر باکتری‌ها مثال پاتوژنها، مانع از

پایداری در دستگاه گوارش تأثیر بگذارد. توانایی چسبندگی باکتری‌های اسید لاکتیک به سطح مخاط برای تشکیل کلونی در دستگاه گوارش ضروری است تا بتوانند به عنوان پروبیوتیک عمل کنند. توانایی چسبندگی این باکتری‌ها می‌تواند تحت تأثیر آب‌گریزی و توانایی تجمع باکتری‌ها (خودتجمعی) قرار گیرد. باکتری‌های اسید لاکتیک که خواص سطحی آب‌گریزی دارند، راحت‌تر به دستگاه گوارش می‌چسبند. علاوه بر این، باکتری‌های اسید لاکتیک که می‌توانند تجمعات یا کلونی‌هایی از همان سوبه را تشکیل دهند، ممکن است فرآیند چسبندگی را در دستگاه گوارش تسهیل کنند (تو و همکاران، ۲۰۱۳).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط مهار رادیکال DPPH و ABTS و

میزان درصد مهار رادیکال‌های آزاد توسط *Lpb. plantarum* sps1 در شکل ۳، نشان داده شده است. گونه‌های فعال اکسیژن (RSO)، مانند یون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل، نیتریک اکسید و پراکسنیتريت می‌توانند با تمامی بیومولکول‌های سلولی واکنش دهند و در صورت تجمع، منجر به استرس اکسیداتیو در بدن شده و باعث بسیاری از شرایط التهابی مزمن در روده شوند (لیو و همکاران، ۲۰۱۸). پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک نیز به دلیل ارتباط آن‌ها با تعاملات میکروب-میزبان و تنظیم سیستم ایمنی توسط میکروبیوم، و همچنین اثرات مفید دیگر مانند فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (لینچ و همکاران، ۲۰۱۸). علاوه بر این، پلی‌ساکاریدها نقش مهمی در کمک به تحمل استرس‌های دستگاه گوارش توسط باکتری‌ها دارند، که منجر به پایداری بیشتر باکتری‌ها در روده و احتمالاً اثرات بهتر بر سلامت میزبان می‌شود. امروزه، به دلیل افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن که باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در بدن می‌شوند و با بسیاری از شرایط التهابی مزمن در روده مرتبط هستند، استراتژی‌های آنتی‌اکسیدانی از منابع طبیعی، از جمله پلی‌ساکاریدهای مشتق شده از باکتری‌های اسیدلاکتیک، به عنوان مداخلات غذایی برای مقابله با تولید بیش از حد و تجمع

(۲۰۱۸). آب‌گریزی بالا به گلیکوپروتئین‌های سطح سلول باکتریایی و آب‌گریزی پایین به پلی‌ساکاریدهای سطح سلول باکتریایی مربوط است. پتانسیل آب‌گریزی در بین سوبه‌ها متفاوت است و به سن و شیمی سطح سلول‌های باکتریایی بستگی دارد (زومیتی، ۲۰۱۸). مکانیسم چسبندگی باکتری‌ها بر روی سطح دستگاه گوارش شامل یک تعامل غیر اختصاصی گروه‌های آب‌گریز و یک تعامل اختصاصی چسبندگی-گیرنده است. تعاملات غیراختصاصی و برگشت‌پذیر می‌توانند از طریق تعاملات فیزیکوشیمیایی، مانند آب‌گریزی سطح سلول‌های لاکتیک اسید باکتری‌ها، رخ دهند. از طرف دیگر، تعاملات اختصاصی و غیرقابل برگشت می‌توانند از طریق واسطه‌گری آدزین‌ها (adhesins)، که یکی از پروتئین‌های موجود بر سطح سلول‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک است و به فرآیند استعمار سطح سلول‌های باکتریایی کمک می‌کند، و گیرنده‌های مکمل بر روی سلول‌های میزبان رخ دهند (لاسکین و همکاران، ۲۰۲۲). خواص آب‌گریزی و خودتجمعی سطح سلول با چسبندگی مرتبط هستند. برای دستیابی به مزایای مورد نظر باکتری‌های پروبیوتیک، آن‌ها باید از طریق تجمع، بیومس به اندازه کافی بزرگی تشکیل دهند (کاروسوا و همکاران، ۲۰۱۹). نورایدا و همکاران (۲۰۱۲)، نشان دادند که نتیجه مثبت آب‌گریزی باکتری‌های اسیدلاکتیک نشان‌دهنده خواص آب‌گریزی آن است. این خواص آب‌گریزی نشان می‌دهد که ممکن است این باکتری‌ها راحت‌تر به دستگاه گوارش بچسبند. چسبندگی میکروبی به هیدروکربن‌ها روش رایجی است که برای اندازه‌گیری خواص آب‌گریزی سطح باکتری‌های اسیدلاکتیک استفاده می‌شود. آب‌گریزی به عنوان تمایل میکروارگانیسم‌ها به یک حلال، مانند هگزان، زایلن یا تولوئن ارزیابی می‌شود (کاروسوا و همکاران، ۲۰۱۹). وقتی پروبیوتیک‌ها به اپیتلیوم می‌چسبند، می‌توانند به طور پایدار در روده عمل کنند. بنابراین، عملکرد پروبیوتیک‌ها می‌تواند برای روده و سلامت آن مفید باشد. همانطور که فریرا و همکاران ذکر کرده‌اند، توانایی خودتجمعی نقش مهمی در ویژگی‌های چسبندگی سلول‌ها ایفا می‌کند و شامل توانایی سلول‌ها برای تشکیل کلونی می‌شود که می‌تواند بر توانایی آن‌ها برای بقا و

(۲۰۱۹). همولیز نیز یک عامل بیماری‌زا است که به میکروارگانیسم‌ها در دسترسی به آهن کمک می‌کند و می‌تواند منجر به کم‌خونی میزبان شود (کتر و همکاران، ۲۰۲۲). در این مطالعه، *Lpb. plantarum* SPS1 هیچ فعالیت همولیتیکی نشان نداد. در مطالعه آزودو و همکاران (۲۰۲۴)، نیز سویه لاکتیک اسید فعالیت همولیتیک نشان نداد. بر اساس مطالعه‌های مختلف لاکتوباسیل‌ها معمولاً به عنوان غیر همولیتیک شناخته می‌شوند. (چن و همکاران، ۲۰۲۲؛ سزیکن و جاگلایویکیوت، ۲۰۲۱؛ هالدر و همکاران، ۲۰۱۷).

تولید آمین بیوژنیک

آمین‌های بیوژنیک، ترکیبات مولکولی کوچکی هستند که در غذاهای پروتئینی، به ویژه غذاهای تخمیری، تشکیل می‌شوند. آمین‌های بیوژنیک از اسیدهای آمینه آزاد توسط دکربوکسیلاسیون میکروبی تشکیل می‌شوند. مصرف بیش از حد آن‌ها برای سلامت انسان مضر است و می‌تواند منجر به مسمومیت غذایی با علائمی مانند تهوع، اسهال و سردرد شود. آمین‌های بیوژنیک، به ویژه هیستامین، با برخی از میکروارگانیسم‌های فساد مرتبط هستند و می‌توانند به عنوان نشانگرهای کیفیت تازگی و ایمنی محصولات غذایی تخمیری استفاده شوند (سان و همکاران، ۲۰۲۳). سطوح اسیدهای آمینه پیش‌ساز به احتمال زیاد بر تولید آمین‌های بیوژنیک توسط میکروارگانیسم‌ها تأثیر می‌گذارد. تیرامین، تربیتامین، فیل‌اتیل‌آمین، هیستامین و کاداورین محصولات دکربوکسیلاسیون هستند که به ترتیب توسط تیروزین دکربوکسیلاز، تربیتوفان دکربوکسیلاز، فیل‌آلانین دکربوکسیلاز، هیستیدین دکربوکسیلاز و لیزین دکربوکسیلاز کاتالیز می‌شوند (لاند و همکاران، ۲۰۱۴). در پژوهش حاضر، تولید آمین بیوژنیک توسط *Lpb. plantarum* SPS1 مشاهده نشد. در مطالعه سان و همکاران (۲۰۲۳)، به خوبی نشان داده شده سوپرناتانت بدون سلول *Lpb. plantarum* می‌تواند به طور قابل توجهی آمین‌های بیوژنیک *M. morganii* را در محیط اسیدی ضعیف (pH 6) مهار کند. علاوه بر این متابولیسم کربوهیدرات و انرژی به طور قابل توجهی کاهش یافت، که نشان می‌دهد *Lpb. plantarum* فعالیت رشد را مهار کرده و

گونه‌های فعال اکسیژن مورد بررسی قرار گرفته‌اند (لیو و همکاران، ۲۰۱۸).

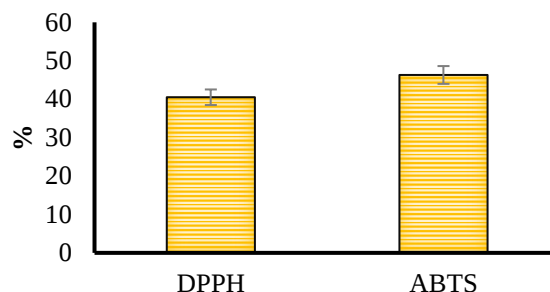


Fig. 3. The antioxidant activity (DPPH & ABTS) of *Lactiplantibacillus plantarum* sps1

در مطالعه پرت و همکاران (۲۰۲۴)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی شیر تخمیری غنی شده با *Lpb. Plantarum* LT100 بهبود یافت. همچنین، داده‌ها نشان دادند که نمونه‌های غنی شده با سویه‌های *Lpb. Plantarum* به طور متفاوتی گونه‌های فعال اکسیژن را تعدیل می‌کنند و اثر محافظتی ضد التهابی دارند. نمونه‌های ماست غنی شده با سویه‌ها *Lpb. Plantarum* FM2 و *Lpb. Plantarum* FM3 به ترتیب ۲۴/۷٪ و ۱۷/۴٪ کاهش ROS نسبت به کنترل مثبت داشتند، که تأیید کننده اثر مشابهی است که قبلاً برای سلول‌های *Lpb. plantarum* مشاهده شده بود (نیلسن، ۲۰۱۷).

دئوکسی ریبونوکلاز و عدم فعالیت همولیتیک

بر اساس نتایج به دست آمده، تولید DNase توسط *Lpb. plantarum* SPS1 منفی بود. DNase، که قادر به تخریب DNA از طریق شکستن اتصالات فسفودی‌استر در استخوانه پشت DNA است، ممکن است در رشد باکتری، بالا بردن فیلم‌بندی بیوفیلم و سیستم ایمنی نقش داشته باشد و بنابراین به عنوان یک عامل ویروس‌یته عمل کند (والرا رامیرز، ۲۰۱۷). هیچکدام از سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک مورد بررسی در مطالعه آزودو و همکاران (۲۰۲۴)، ژلاتیناز، لیپاز یا DNase تولید نکردند. یافته‌های مشابه در چند مطالعه دیگر نشان داده شده است که سویه‌های باکتری اسیدلاکتیک تولید کننده ژلاتیناز و DNase وجود ندارند (جاود و همکاران، ۲۰۲۲؛ کتر و همکاران، ۲۰۲۲؛ پینو و همکاران، ۲۰۲۰؛ سیلا و همکاران،

سینگ، ۲۰۰۵). عدم حضور ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیکی یک جنبه حیاتی از ایمنی محصول است. با این حال، گزارش‌های متعددی وجود دارد که به کیفیت پایین پروبیوتیک‌های موجود در بازار اشاره می‌کنند (زاویستوسکا و همکاران، ۲۰۲۲). این موضوع به دلیل تعداد ناکافی میکروارگان‌های زنده، نامشخص بودن برخی از آن‌ها یا حتی عدم حضور آن‌ها می‌باشد. مصرف محصولات پروبیوتیک ممکن است منجر به انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به باکتری‌های روده انسان شود. علاوه بر این، بسیاری از ژن‌های مقاوم به میکروب و مقاوم به آنتی‌بیوتیک با عناصر ژنتیکی متحرک و فاژها مرتبط هستند، و انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به باکتری‌های دیگر ممکن است باعث کاهش کارایی درمان آنتی‌بیوتیکی شود (زاویسیک و همکاران، ۲۰۲۳). در این مطالعه مقاومت سویه *Lpb. plantarum* sps1 به هشت آنتی‌بیوتیک رایج مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲). این سویه نسبت به شش آنتی‌بیوتیک حساس، نسبت به امپنم مقاوم و نسبت به جنتامایسین نیمه حساس بود. شواهدی وجود دارد که گونه‌های لاکتوباسیلوس معمولاً به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند اریترومایسین، کلرامفنیکل و تتراسایکلین حساس هستند (علیزاده و بهبهانی و همکاران، ۲۰۲۳). گوتچیواو همکاران (۲۰۱۸). پنج سویه *Lpb. plantarum* مقاوم به سفتریاکسون و آمپی سیلین، یک داروی سفالوسپورین که لایه پپتیدوگلیکان را آسیب می‌زند، پیدا کردند. با این حال، اسید لاکتیک باکتری تا زمانی که زنی برای انتقال افقی نداشته باشد، ایمن تلقی می‌شود.

Table 2. Effect of common antibiotics on the growth of *Lactiplantibacillus plantarum* sps1

Antibiotic	Antibiotic resistance
Vancomycin	Sensitive
Gentamicin	Intermediate
Chloramphenicol	Sensitive
Nitrofurazone	Sensitive
Nalidixic	Sensitive
Penicillin	Sensitive
Imipenem	Resistance
Ciprofloxacin	Sensitive

محتوای آمین‌های بیوژنیک *M. morganii* را کاهش داده است (سان و همکاران، ۲۰۲۳). استارتر *Lpb. plantarum* SK15 نیز توانست از تجمع آمین‌های بیوژنیک در طول تخمیر در یک نوع نوشیدنی قارچی جلوگیری کرد (ماخامورتانگ و همکاران، ۲۰۲۱).

قابلیت حذف کلسترول

میزان توانایی *Lpb. plantarum* sps1 در کاهش میزان کلسترول $0.50 \pm 0.30/42$ درصد بود. کلسترول، به‌عنوان یکی از اجزای حیاتی بدن انسان، نقش اساسی در بسیاری از فرآیندها ایفا می‌کند. با این حال، با وجود سطوح طولانی‌مدت و بالای کلسترول خون، آترواسکلروز ممکن است آغاز شود و خطر بزرگی برای بروز بیماری‌های قلبی عروقی به‌وجود بیاورد. در طول سال‌ها، مطالعه‌های متعددی به‌صورت آزمایش‌های برون تنی برای بررسی اثر کاهش کلسترول باکتری‌های اسیدلاکتیک، به‌ویژه سویه‌های *Lpb. plantarum* انجام شده است. در میان سویه‌های *Lpb. Plantarum* جدا شده از شیر بز، بیشترین کاهش کلسترول در *Lpb. plantarum* Lpb02 با 68% و دومین میزان کاهش در *Lpb. plantarum* Lpb01 مشاهده شد، در حالی که سویه تجاری *Lpb. plantarum* ATCC 8014 توانایی کاهش 51% را نشان داد (اسلام و همکاران، ۲۰۲۲). آلبانو و همکاران (۲۰۱۸)، کلسترول و نمک‌های صفراوی را به محیط کشت اضافه کردند و دریافتند که گونه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک با دامنه‌ای بین 42% تا 55% بهترین توانایی را در حذف کلسترول داشتند، این امر ممکن است به دلیل رفتارها و مسیرهای متفاوت گونه‌ها و سویه‌ها در کاهش کلسترول باشد و هر سویه پروبیوتیکی می‌تواند فعالیت‌های متابولیکی مختلفی داشته باشد (آلبانو و همکاران، ۲۰۱۸).

آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها

زنجیره غذایی به عنوان یکی از مسیرهای اصلی انتقال باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بین جمعیت‌های حیوانی و انسانی در نظر گرفته می‌شود. به‌ویژه، محصولات لبنی تخمیر شده که قبل از مصرف حرارت داده نمی‌شوند، راهی برای انتقال باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به‌شمار می‌رود (ماتور و

خاصیت ضد چسبندگی سلول

برای ارزیابی توانایی سویه جدا شده در جلوگیری از چسبندگی پاتوژن‌ها به مخاط روده، آزمایش‌های مختلف ضد چسبندگی شامل آزمایش‌های رقابتی، مهاری و جابه‌جایی در مقابل پاتوژن *S. Typhimurium* انجام شد. نتایج این ارزیابی در شکل ۴، نشان داده شده است.

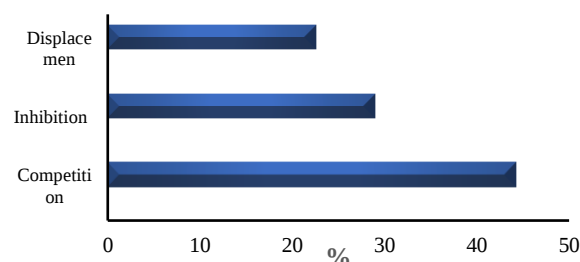


Fig 4. Anti-adhesion assays (competition, inhibition and displacement) of *Lactiplantibacillus plantarum* sps1 against *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*

زمانی که *Lpb. plantarum* sps1 به چاهک به طور همزمان با *S. Typhimurium* اضافه شد ۴۴/۲ درصد از چسبندگی پاتوژن کاهش یافت. زمانی که سویه جدا سازی شده ابتدا به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۱ ساعت انکوباسیون، سویه بیماری‌زا اضافه شد، ۲۹ درصد چسبندگی سویه پاتوژن کاهش یافت. زمانی که *S. Typhimurium* برای اولین بار به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۱ ساعت انکوباسیون، *Lpb. plantarum* sps1 به چاهک‌ها افزوده شد، سویه پروبیوتیک قادر به حذف ۲۲/۵ درصد از باکتری‌های پاتوژن متصل به سلول‌های Caco-۲ شد. سویه‌های لاکتوباسیلوس *Lpb. plantarum* TW57-4 بیشترین فعالیت را علیه *P. aeruginosa* و سویه‌های *Lpb. plantarum* 5H1، *Lpb. plantarum* 5 L1 و *Lcb. rhamnosus* GG کاهش بیشتری در چسبندگی سالمونلا در محدوده ۵۶-۷۳٪ داشتند (وسیعی و همکاران، ۲۰۲۲؛ لاز و همکاران، ۲۰۲۱). توانایی جابجایی سویه می‌تواند به دلیل رقابت برای گیرنده‌های چسبندگی مشترک، تولید ترکیبات ضد چسبندگی و ترشح عوامل ضد میکروبی باشد. مکانیزم‌های مختلفی در فرایندهای ضد

چسبندگی باکتریایی شامل تعاملات شیمیایی و فیزیکی میان سطح باکتری و سطح میزبان یا محیط دخیل هستند. همبستگی بین نتایج ضد چسبندگی و چسبندگی می‌تواند نشان دهد که مکانیزم‌های مشابهی در هر دو پدیده دخیل هستند. به عبارت دیگر، پژوهش‌های دیگر نیز گزارش داده‌اند که هیچ همبستگی بین نتایج ضد چسبندگی و چسبندگی وجود ندارد (حق‌شناس و همکاران، ۲۰۱۶).

نتیجه‌گیری

سویه *Lpb. plantarum* SPS1 دارای قابلیت بالقوه برای زنده‌مانی در شرایط اسیدی با pH مختلف است. این سویه در مقابل غلظت‌های مختلف نمک صفراوی مقاوم بوده که این ویژگی می‌تواند برای زنده‌مانی در محیط‌های مانند روده کاربرد داشته باشد. سویه مورد بررسی دارای هیدروفوبیسیته و تجمع خودکار مناسب است که می‌تواند به ارتباطات با سایر سلول‌ها و چسبندگی به سطوح مختلف کمک کند. این ویژگی‌ها می‌توانند موجب شوند سویه به عنوان یک پروبیوتیک کارآمد شناخته شود و در جلوگیری از چسبندگی باکتری‌های بیماری‌زا به سلول‌های اپیتلیال موثر باشد. با توجه به نتایج حاصل از آزمون‌های تولید آمین‌های بیوژنیک، فعالیت DNase، عدم فعالیت همولیتیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌توان بیان کرد استفاده از *Lpb. plantarum* SPS1 در بهبود سلامتی و کاهش خطرات بیماری‌ها موثر است و در نهایت می‌توان از این سویه به عنوان پروبیوتیکی موثر در بهره برد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت مالی طرح پژوهشی به شماره ۱۴۰۲/۴۴ که این مقاله مستخرج از آن می‌باشد، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

- Abdoli H, Sa'i Dehkordi SS, Mobini Dehkordi M, and Abtahi Forushani SM, 2018. The first isolation and identification of the molecular activities of indigenous lactobacilli with probiotic potential from traditional Iranian rind cheese and their antioxidant properties. *Microbial Biology* 8(32): 25–39. doi: 10.22108/bjm.2018.111602.1139.
- Alizadeh Behbahani B, Barzegar H, Mehrnia M A and Ghodsi M, 2023. Probiotic Characterization of *Limosilactobacillus fermentum* Isolated from Local Yogurt: Interaction with Pathogenic Bacteria and Caco-2 Enteric Cell Line. *Nutrition and Food Sciences Research*; 10 (1) :37-45. <http://nfsr.sbmu.ac.ir/article-1-593-fa.html>
- Alizadeh Behbahani B, Jooyandeh H, Falah F and Vasiee, A, 2020. Gamma-aminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* A3: Optimization of production, antioxidant potential, cell toxicity, and antimicrobial activity. *Food Science & Nutrition*, 8(10), 5330-5339. DOI: 10.1002/fsn3.1838
- Alizadeh Behbahani B, Jooyandeh H, Hojjati M and Sheikhjan, M G, 2024. Evaluation of probiotic, safety, and anti-pathogenic properties of *Levilactobacillus brevis* HL6, and its potential application as bio-preservatives in peach juice. *LWT*, 191, 115601.
- 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*, 188, 115428. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115428>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103677>
- Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Vasiee A and Brück W M, 2024. Probiotic *Bacillus* strains inhibit growth, biofilm formation, and virulence gene expression of *Listeria monocytogenes*. *LWT*, 191, 115596. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115596>
- Azevedo I, Barbosa J, Albano H, Nogueira T and Teixeira, P, 2024. Lactic Acid Bacteria isolated from traditional and innovative alheiras as potential biocontrol agents. *Food Microbiology*, 119, 104450. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104450>.
- Barzegar H, Alizadeh Behbahani B and 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. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2365>
- Barzegar H, Behbahani B A, Mirzaei and Sheikhjan M G, 2023. Assessing the protection mechanisms against *Enterobacter aerogenes* by analyzing aggregation, adherence, antagonistic activity, and safety properties of potentially probiotic strain *Lactobacillus brevis* G145. *Microbial pathogenesis*, 181, 106175.
- Bourdichon F, Laulund S and Tenning P, 2019. Inventory of microbial species with a rationale: a comparison of the IDF/EFFCA inventory of microbial food cultures with the EFSA Biohazard Panel qualified presumption of safety. *FEMS microbiology letters*, 366(5), fnz048. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz048>.
- Chen J, Pang H, Wang L, Ma C, Wu G, Liu Y, Guan Y, Zhang M, Qin G and Tan Z, 2022. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria strains with antimicrobial activity screened from bamei pig feces, 1–13. <https://doi.org/10.3390/foods11050709>.
- Cizeikiene D and Jagelaviciute J, 2021. Investigation of antibacterial activity and probiotic properties of strains belonging to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera for their potential application in functional food and feed products. *Probiotics Antimicrob Proteins* 13, 1387–1403. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09777-5>.
- Collado C M, Meriluoto J and Salmin P, 2007. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus, *Food Research International*, Volume 40, Issue 5, 629-636, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.11.007>.
- Dardmeh N, yavarmanesh M, Moazzami A A, moghaddam matin M and Noorbakhsh H, 2023. In vitro evaluation of probiotic properties of commercial strains *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *FSCT* 2023; 19 (133) :91-102.

- Echresh S, Behbahani B A, Falah F, Noshad M and Ibrahim S A, 2024. Assessment of the probiotic, anti-bacterial, and anti-biofilm characteristics of *Lactocaseibacillus rhamnosus* CWKu-12, along with its potential impact on the expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* ATCC 19115. *LWT*, 116391.
- Falah F, Mortazavi SA and Tabatabaei Yazdi F, 2019. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus brevis* strain pml1 based on the ability to adhesion to the epithelial cells of intestine. *journal of applied microbiology in food industry*, 5(1), 41-53.
- Falah F, Vasiee A, Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F and Mortazavi S A, 2021. Optimization of gamma-aminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* PML1 in dairy sludge-based culture medium through response surface methodology. *Food Science & Nutrition*, 9(6), 3317-3326.
- Falah F, Vasiee A, Behbahani B A, Yazdi F T, Moradi S, Mortazavi S A and Roshanak S, 2019. Evaluation of adherence and anti-infective properties of probiotic *Lactobacillus fermentum* strain 4-17 against *Escherichia coli* causing urinary tract infection in humans. *Microbial pathogenesis*, 131, 246-253. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.006>
- Falah F, Zareie Z, Vasiee A, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi S A and Alizadeh Behbahani B, 2021. Production of synbiotic ice-creams with *Lactobacillus brevis* PML1 and inulin: functional characteristics, probiotic viability, and sensory properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(6), 5537-5546.
- Gabriela K, Ivana H and iveta H, 2019. In vitro evaluation of adhesion capacity ,hydrophobicity, and auto-aggregation of newly isolated potential probiotic strains .*Fermentation*. 54:1-11 .<https://doi.org/10.3390/fermentation5040100>.
- Garcia-Gonzalez N, Battista N, Prete R and Corsetti A, 2021. Health-promoting role of *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from fermented foods. *Microorganisms*, 9(2), 349. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020349>.
- Gotcheva V, Petrova G, Petkova M, Kuzmanova Y and Angelov A, 2018. Molecular and in vitro assessment of some probiotic characteristics of amylolytic *Lactobacillus plantarum* strains from Bulgarian fermented products. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 820-830.830. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800054>.
- Haghshenas B, Haghshenas M, Nami Y, Khosroushahi A Y, Abdullah N, Barzegari A and Hejazi M S, 2016. Probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Enterococcus mundtii* 50H isolated from traditional dairies microbiota. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 6(1), 37. doi: 10.15171/apb.2016.07.
- Halder D, Mandal M, Chatterjee S S, Pal N K and Mandal S, 2017. Indigenous probiotic *Lactobacillus* isolates presenting antibiotic like activity against human pathogenic bacteria. *Biomedicines* 5, 1–11. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5020031>.
- 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*, 14(1), 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.08.001>
- Huang W, Dong A, Pham H T, Zhou, C, Huo Z, Wätjen A P, Prakash S, Bang-Berthelsen C H and Turner M S, 2023. Evaluation of the fermentation potential of lactic acid bacteria isolated from herbs, fruits and vegetables as starter cultures in nut-based milk alternatives. *Food Microbiol.* 112, 104243. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104243>.
- Islam M Z, Jahan N, Liza, R I, Sojib M S I, Hasan M S, Ferdous T and Rashid MH U, 2022. Newly characterized *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from raw goat milk as probiotic cultures with potent cholesterol-lowering activity. *Journal of Agriculture and Food Research*, 10, 100427. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100427>.
- Isvand Heydari E, Jooyandeh H, Hojjati M, Alizadeh Behbahani B, and Noshad M, 2021. Assessment of antimicrobial and viability of *Lactobacillus plantarum* LZ95 under acidic and bile conditions. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 17(4): 533-541. doi: 10.22067/ifstrj.v17i4.85831
- Javed, G A, Arshad N, Munir A, Khan S Y, Rasheed S, Hussain I, 2022. Signature probiotic and pharmacological attributes of lactic acid bacteria isolated from human breast milk. *Int. Dairy J.* 127 <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105297>

- Keter M T, El Halfawy N M and El-Naggar MY, 2022. Incidence of virulence determinants and antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from food products. *Future Microbiol.* 17, 325–337. <https://doi.org/10.2217/fmb-2021-0053>.
- Koushki V, Vatandoost J, Mortazavi S A, Jannat Abadi A A and Hosseini S A, 2005. Isolation and biochemical and molecular identification of probiotic bacteria from traditional dairy products of Sabzevar. *Sabzevar University of Medical Sciences Journal*, 20(5), 726–737.
- Krausova G, Hyrslova I and Hynstova I, 2019. In Vitro Evaluation of Adhesion Capacity, Hydrophobicity, and Auto-Aggregation of Newly Isolated Potential Probiotic Strains. *Fermentation*; 5:100. <https://doi.org/10.3390/fermentation5040100>.
- Laskin A I, Bennett J W and Gadd G M, 2003. *Advances in applied microbiology*. Academic Press.
- Li X, Xu W, Yang J, Zhao H, Pan C, Ding X and Zhang Y, 2016. Effects of applying lactic acid bacteria to the fermentation on a mixture of corn steep liquor and air-dried rice straw. *Animal Nutrition*, 2(3), 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.04.003>.
- Liu Z, Ren Z, Zhang J, Chuang C C, Kandaswamy E, Zhou T, Zuo L, 2018. Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Front. Physiol.* 2018, 9, 477. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00477>.
- Lund P, Tramonti A and De Biase D, 2014. Coping with low pH: molecular strategies in neutrophilic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 38(6), 1091–1125. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12076>.
- Luz C, Calpe J, Quiles J M, Torrijos R, Vento M, Gormaz M, et al., 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. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104599>.
- Lynch K M, Zannini E, Coffey A and Arendt E K, 2018. Lactic Acid Bacteria xopolysaccharides in Foods and Beverages: Isolation, Properties, Characterization, and Health Benefits. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2018, 9, 155–176. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012537>.
- Makhamrueang N, Sirilun S, Sirithunyalug J, Chaiana W, Wangcharoen W, Peerajan S and Chaayasut, C, 2021. *Lactobacillus plantarum* SK15 as a Starter Culture for Prevention of Biogenic Amine Accumulation in Fermented Beverage Containing *Herichium erinaceus* Mushroom. *Applied Sciences*, 11(15), 6680. <https://doi.org/10.3390/app11156680>.
- Mao B, Yin R, Li X, Cui S, Zhang H, Zhao J and Chen W, 2021. Comparative Genomic Analysis of *Lactiplantibacillus plantarum* Isolated from Different Niches. *Genes* 12, 241. <https://doi.org/10.3390/genes12020241>.
- Mathur S and Singh R, 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International journal of food microbiology*, 105(3), 281–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>.
- Medina-Pradas E, Pérez-Díaz I M, Garrido-Fernández A and Arroyo-López F N, 2017. Chapter 9—Review of Vegetable Fermentations with Particular Emphasis on Processing Modifications, Microbial Ecology, and Spoilage. In *The Microbiological Quality of Food*; Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, pp. 211–236. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00012-1>.
- Mokoena M P, Omatola C A and Olaniran A O, 2021. Applications of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins against Food Spoilage Microorganisms and Foodborne Pathogens. *Molecules*, 26, 7055. <https://doi.org/10.3390/molecules26227055>.
- Momenzadeh S, Juyandeh H, Alizadeh Behbahani B and Barzegar H, 2020. Evaluation of probiotic and antibacterial properties of *Lactobacillus fermentum* SL163-4. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 17(2), 233–242. <https://doi.org/10.22067/iftstrj.2020.39266>.
- Mousanejadi N, Barzegar H, Alizadeh Behbahani B and Joyandeh H, 2023. Production and evaluation of a functional fruit beverage consisting of mango juice and probiotic bacteria. *Food Measure* 3253–3240, 17. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-01862-3>.
- Nezhad S J E, Dovom M R E, Najafi M B H, Yavarmanesh M and Mayo B, 2020. Technological characteristics of *Lactobacillus* spp. isolated from Iranian raw milk Motal cheese. *LWT*, 133, 110070. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110070>.

- Nielsen SS, 2017. Total Carbohydrate by Phenol-Sulfuric Acid Method. In Food Analysis Laboratory Manual; Food Science Text Series; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6_14.
- Noshad M, Alizadeh Behbahani B and Hojjati M, 2011. Evaluation of probiotic and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditional Doogh of Behbahan. Food Industry Research Journal, 31(4), 2021.
- Nouri S, Nazari S and Hosseini S, 2011. Isolation and biochemical and molecular identification of *Lactobacillus plantarum* from the rhizosphere of Lenjan rice roots. Scientific-Research Quarterly of Microorganism Biology, 9(29).
- Nuraida L, Anggraeni D and Dewanti-Hariyadi R, 2012. Adherence properties of lactic acid bacteria as probiotic candidates isolated from breast milk.
- Oldak A, Zielińska D, Rzepkowska A and Kołożyn-Krajewska D, 2017. Comparison of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski cheese. BioMed research international, 2017(1), 6820369. <https://doi.org/10.1155/2017/6820369>.
- Panel E B and Herman L, 2021. Statement on the update of the list of QPS-recommended bio-logical agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 14: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2021. EFSA Journal. 19, e06377. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6689>.
- Pino A, Russo N, Van Hoorde K, De Angelis M, Sferrazzo G, Randazzo CL and Caggia C, 2019. Piacentinu Ennese PDO Cheese as Reservoir of Promising Probiotic Bacteria. Microorganisms;7(8).254. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080254>.
- Pinto A, Barbosa J, Albano H, Isidro J and Teixeira P, 2020. Screening of bacteriocinogenic lactic acid bacteria and their characterization as potential probiotics. Microorganisms 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030393>.
- Prete R, Dell'Orco F, Sabatini Gi, Montagano F, Battista N and Corsetti A, 2024. Improving the Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Fermented Milks with Exopolysaccharides-Producing *Lactiplantibacillus plantarum* Strains. Foods. 13. 1663. <https://doi.org/10.3390/foods13111663>.
- Rouhi A, Falah F, Azghandi M, Behbahani B A, 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, 191, 115669. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115669>
- Ryu E H and Chang H C, 2013. In vitro study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from kimchi. Annals of microbiology, 63, 1387-1395. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0599-8>.
- Saboktakin-Rizi M, Alizadeh Behbahani B, Hojjati M, 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. 15:2615–2624. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00846-5>
- Shirani K, Falah F, Vasiee A, Yazdi F T, Behbahani B A and Zanganeh H, 2022. Effects of incorporation of *Echinops setifer* extract on quality, functionality, and viability of strains in probiotic yogurt. Journal of Food Measurement and Characterization, 16(4), 2899-2907.
- Sidhu P K and Nehra K, 2019. Bacteriocin-nanoconjugates as emerging compounds for enhancing antimicrobial activity of bacteriocins. Journal of King Saud University - Science. 31, 758–767. Pages 758-767. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.12.007>.
- Silva J, Barbosa J, Albano H, Sequeira M, Pinto A, Bonito CC, Saraiva M and Teixeira P, 2019. Microbiological characterization of different formulations of alheiras (fermented sausages). AIMS Agric. Food 4, 399–413. <https://doi.org/10.3934/AGRFOOD.2019.2.399>.
- Sun Z, Zhang Y, Lin X, Zhang S, Chen Y, Ji C, 2023. Inhibition Mechanism of *Lactiplantibacillus plantarum* on the Growth and Biogenic Amine Production in *Morganella morganii*. Foods. 29;12(19):3625. doi: 10.3390/foods12193625. PMID: 37835277; PMCID: PMC10572400. <https://doi.org/10.3390/foods12193625>.

- Terefe N S, 2016. Emerging trends and opportunities in food fermentation.
- Touret T, Oliveira M and Semedo-Lemsaddek T, 2018. Putative probiotic lactic acid bacteria isolated from sauerkraut fermentations. PloS one, 13(9), e0203501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203501>
- Tuo Y, Yu H, Ai L, Wu Z, Guo B and Chen W, 2013. Aggregation and adhesion properties of 22 Lactobacillus strains. J. Dairy Sci. 2013; 96:4252–4257. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6547>.
- Van Thu T, Foo H L, Loh T C and Bejo M H, 2011. Inhibitory activity and organic acid concentrations of metabolite combinations produced by various strains of Lactobacillus plantarum. African Journal of Biotechnology, 10(8), 1359-1363. DOI: 10.5897/AJB10.1610.
- Varela-Ramirez A, Abendroth J, Mejia A A, Phan I Q, Lorimer D D, Edwards TE and Aguilera R J, 2017. Structure of acid deoxyribonuclease. Nucleic Acids Res. 45 (10), 6217–6227. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx222>.
- Vasechi N, Iranmanesh M, Haj Ghasemi M, Karimi Tarshizi M A and Mozhgani N, 2020. Measurement of hydrophobicity, adhesion, and colonization of probiotic Lactobacillus strains under in vitro conditions. Veterinary Microbiology Journal, 16(1), 21–31.
- Vasiee A R, Mortazavi A, Tabatabaei-yazdi F and Dovom, M R, 2018. Detection, identification and phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh, Iranian fermented cereal product, by amplifying the 16s rRNA gene with universal primers and differentiation using rep-PCR. International Food Research Journal, 25(1).
- Vasiee A R, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A and Edalatian M R, 2014. Isolation, identification and characterization of probiotic Lactobacilli spp. from Tarkhineh. International Food Research Journal, 21(6).
- 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. 1;10(2):258-68. DOI 10.1007/s12602-017-9282-x
- 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 ioengineering.;130(5):471-9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.07.002>.
- 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. <https://doi.org/10.1111/jam.15772>.
- Vasiee A, Falah F, Sankian M, Tabatabaei-Yazdi F and Mortazavi SA, 2022. Oral immunotherapy using probiotic ice cream containing recombinant food-grade Lactococcus lactis which inhibited. allergic responses in a BALB/c mouse model. Journal of Immunology Research. 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2635230>.
- Yang S J, Kim K-T, Kim TY, Paik H-D, 2020. Probiotic properties and antioxidant activities of Pediococcus pentosaceus SC28 and Levilactobacillus brevis KU15151 in fermented black gamju .Foods ;9(9):1154. <https://doi.org/10.3390/foods9091154>.
- 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. 9(4):338. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040338>.
- Zavišić G, Popović M, Stojkov S, Medić D, Gusman V, Jovanović Lješković N and Jovanović Galović, A, 2023. Antibiotic resistance and probiotics: knowledge gaps, market overview and preliminary screening. Antibiotics, 12(8), 1281. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081281>
- Zawistowska-Rojek A, Zaręba T and Tyski S, 2022. Microbiological testing of probiotic preparations. International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(9), 5701. <https://doi.org/10.3390/ijerph19095701>.
- Zhou Q, Gu R, Li P, Lu Y, Chen L and Gu Q, 2020. Anti-Salmonella mode of action of natural L-phenyl lactic acid purified from Lactobacillus plantarum ZJ316. Applied Microbiology and Biotechnology, 104, 5283-5292. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10503-4>

- 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. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-51129-6>
- Zibaei-Rad A, Rahmati-Joneidabad M, Behbahani B A and Taki M, 2023. Assessing the protection mechanisms on *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 by potentially probiotic strain *Lactocaseibacillus casei* XN18: An experimental and modeling study. Microbial pathogenesis, 181, 106177.
- Zommiti M, Bouffartigues E, Maillot O, Barreau M, Szunerits S, Sebei K and Ferchichi M, 2018. In vitro assessment of the probiotic properties and bacteriocinogenic potential of *Pediococcus pentosaceus* MZF16 isolated from artisanal Tunisian meat “Dried Ossban”. Frontiers in microbiology, 9, 2607.