مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۲ شماره ۴/ سال ۱۴۰۱/ صفحات ۵۷ تا ۷۳
DOI: 10.22034/FR.2022.48699.1809

بررسی خاصیت پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* جداسازی شده از یک نوع پنیر سنتی ایرانی

نیلوفر گلباغی[۱] ، مهنوش پارسایی مهر*[۲]، اشکان جبلی جوان[۳] و آزاده سلیمی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۲/۲۵

[۱] دانش آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان
[۲] استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان
[۳] دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان
* مسئول مکاتبه : Email: mparsaei@semnan.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی با اثرات مفید بر سلامت انسان هستند. جداسازی باکتری‌های جدید با توانمندی پروبیوتیکی موجب گسترش کارایی این گروه از میکروارگانیسم‌ها در سلامت انسان و حیوانات می‌گردد. هدف از این مطالعه بررسی پتانسیل *پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پارا کازئی* جدا شده از پنیر سنتی سمنان می‌باشد. **روش کار**: در این مطالعه به بررسی پتانسیل پروبیوتیکی سویه *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* جدا شده از پنیر سنتی سمنان توسط گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان پرداخته شد. برای این منظور برخی از پارامترهای پروبیوتیکی نظیر مقاومت و زنده‌مانی در محیط اسیدی و صفراوی، زنده‌مانی در محیط شبیه‌سازی شده روده‌ای و معده‌ای، خاصیت هیدروفوبیستی، ویژگی‌های خود تجمعی و تجمع توام و خاصیت ضد میکروبی جدایه‌ها در برابر دو باکتری *اشریشیا کلی* به عنوان شاخص باکتری گرم منفی و *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان شاخص باکتری‌های گرم مثبت مورد ارزیابی قرار گرفت. **نتایج**: نتایج این تحقیق نشان داد که در مجموع، جدایه‌ی *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* با ۷۵/۵ درصد زنده‌مانی در محیط اسیدی، کمتر از ۳۰ دقیقه تاخیر رشد در حضور صفرا، اثر ضد میکروبی مناسب بر علیه دو باکتری بیماری‌زا، ۵۷/۸۲ درصد آبگریزی سطحی و ۹۲/۴۵ درصد قدرت خودتجمعی و دارا بودن قدرت تجمعی توام بالا علیه دو باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* توانمندی پروبیوتیکی مناسبی را نشان داد. **نتیجه گیری نهایی**: با توجه به نتایج به دست آمده، جدایه *لاکتوباسیوس پاراکازئی* با دارا بودن ویژگی‌های لازم می‌تواند به عنوان پروبیوتیک مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: پتانسیل پروبیوتیکی، پنیر سنتی سمنان، *لاکتوباسیلوس پارا کازئی*

مقدمه

امروزه مواد غذایی پروبیوتیک بعنوان غذاهای فراسودمند و بهبود دهنده سطح سلامتی مورد توجه می‌باشند. پروبیوتیک‌ها به طور گسترده در مکمل‌ها و غذاهای فراسودمند استفاده می‌شوند (آرگیری و همکاران، ۲۰۱۳). بخش عمده‌ی باکتری‌های پروبیوتیک را

باکتری‌های اسیدلاکتیک [1]تشکیل می‌دهند. سویه‌های LAB مختلفی برای میزبان مفید شناخته شده‌اند و برای کاربرد بعنوان پروبیوتیک انتخاب شده‌اند. از میان آن‌ها لاکتوباسیل‌ها یکی از گروه‌های اصلی میکروبی می‌باشند. آن‌ها در طیف وسیع محصولات غذایی وجود دارند. این باکتری‌ها جز میکروبیوتای نرمال دهان، روده و دستگاه تناسلی زنان می‌باشند و همچنین در مواد لبنی، گوشت و سطح برگ گیاهان نیز یافت می‌شوند (بوو و همکاران، ۲۰۱۲). *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* [2]از گونه‌های لاکتوباسیلوس‌های مورد استفاده در محصولات تخمیری است که به‌طور طبیعی در دهان و مسیر گوارشی انسان یافت می‌شود (اورلاندا و همکاران، ۲۰۱۲، خزائی و همکاران، ۲۰۱۹). تا کنون بالغ بر ۳٤ سویه از این گونه یافت شده است که این سویه‌ها از کشورهای مختلف دنیا جدا شده‌اند (اسموکوینا و همکاران، ۲۰۱۳). *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* یک باکتری گرم مثبت مزوفیل، هموفرمانتاتیو اجباری، میکروآئروفیل، کاتالاز منفی و فاقد اسپور بوده وظرفیت بالایی برای تولید اسید دارد (وارد و تیمینس، ۱۹۹۹). این باکتری قادر به تحمل دامنه گسترده‌ای از pH و دما است و تکمیل کننده رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* سازنده آنزیم آمیلاز(آنزیم جذب کربوهیدرات) است؛ و به طور گسترده ای درمحصولات لبنی و نوشیدنی های تخمیری مورد استفاده قرار می‌گیرد (سادات رسول و همکاران، ۱۳۹۷). به منظور تأمین تقاضای روزافزون بازار، تحقیق بر روی سویه‌های جدید پروبیوتیک که خصوصیات پروبیوتیکی بهتری نسبت به انواع موجود در بازار دارند و به دست آوردن محصولات فراسودمند که کشت‌های پروبیوتیک در آن‌ها فعال هستند، حائز اهمیت می باشد (وردنلی و همکاران، ۲۰۰۹). مواد غذایی تخمیری سنتی منبع غنی از میکروارگانیسم‌ها هستند و برخی از آن‌ها ویژگی‌های پروبیوتیکی نشان می‌دهند. بر این اساس علاقه رو به رشدی به استفاده تجاری سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از محصولات طبیعی سنتی و بومی به ویژه محصولات لبنی و تخمیری که دارای اثرات ارتقا دهنده سلامت می‌باشند، وجود دارد. به طور کلی پذیرفته شده است که پروبیوتیک‌ها می‌توانند اثرات سودمندی نشان دهند. نحوه عملکرد که تاکنون به خوبی مورد پذیرش است شامل تولید مواد ضد میکروبی، رقابت برای مواد مغذی، رقابت با اتصال پاتوژن‌ها و تحریک سیستم ایمنی می‌باشد (بائو و همکاران، ۲۰۱۰ ، پارسایی مهر و همکاران،۲۰۱۹).

برای آن که باکتری‌های پروبیوتیک بتوانند نقش خود را ایفا کنند باید قادر باشند بر سدهای فیزیکی و شیمیایی، مجاری معده‌ای-روده‌ای، به ویژه استرس اسید و صفرا غلبه کنند (مویانو و همکاران، ۲۰۰۸).

بر طبق دستورالعمل‌های مشترک کارگروه FAO/WHO برای ارزیابی پروبیوتیک‌ها در مواد غذایی مطالعات آزمایشگاهی مناسب می‌بایست سلامت‌بخشی بالقوه پروبیوتیک‌ها را قبل از انجام آزمایشات بالینی اثبات کنند (مونتکگودوو همکاران، ۲۰۱۲). برخی آزمون‌های آزمایشی مانند مقاومت به اسید و صفرا و تولید ضدمیکروب‌ها معمولا بعنوان اولین مرحله برای انتخاب میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بالقوه به کار می‌روند (گالگو و همکاران، ۲۰۱۳). پیش‌شرط‌های پروبیوتیک‌ها عبارتند از اینکه آن‌ها باید به عنوان افزودنی مجاز شناخته شده باشند، قادر به تحمل اسید، پپسین و صفرا باشند، فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های پاتوژن نشان دهند و چسبندگی خوبی به موکوس روده‌ای داشته باشند. مهمترین عملکرد پروبیوتیک‌ها بهبود تعادل میکروبی روده‌ی میزبان است و سایر مزایا شامل افزایش مقاومت به بیماری‌ها و سطح سلامت عمومی و حتی برخی اثرات درمانی در برخی از بیماری‌های مزمن مانند هایپرکلستریمیا می‌باشد (گائو و همکاران، ۲۰۱۲). باکتری‌های پروبیوتیک باید توانایی‌های زیادی برای چسبیدن به اپیتلیوم روده داشته باشند که پیش شرطی

[1] Lactic acid bacteria (LAB)

[2] *Lactobacillus paracasei*

برای بهبود میکروبیوتای روده می‌باشد (کولادو و همکاران، ۲۰۰۷). به نظر می‌رسد خودتجمعی[1] سویه‌های پروبیوتیک می‌تواند ظرفیت اتصال سلول‌های باکتریایی به سلول‌های اپیتلیالی روده‌ای را تحت تاثیر قرار دهد و تجمع توام[2] با پاتوژن‌ها می‌تواند از کلونیزاسیون پاتوژن‌ها در روده جلوگیری کند (راموس و همکاران، ۲۰۱۳). مهار پاتوژن‌ها توسط پروبیوتیک‌ها می‌تواند محافظ مهمی برای سلامت انسان در برابر عفونت ناشی از عوامل بیماریزا باشد و عامل بازدارنده طبیعی در مقابل پاتوژن‌ها در مجاری گوارشی به حساب می‌آید (کولادو و همکاران، ۲۰۰۷).

پنیر سنتی سمنان یکی از پنیرهای پرطرفدار در استان سمنان است. تاکنون مطالعه‌ای در زمینه‌ی ویژگی‌های پروبیوتیک سویه‌های لاکتوباسیل جدا شده از پنیر سنتی خیکی سمنان انجام نشده است. بعلاوه تحقیق درباره سویه‌های پروبیوتیک جدید به منظور تامین تقاضای رو به افزایش بازار و تولید غذاهای با کارکرد مطلوبی که خاصیت پروبیوتیک در آنها فعال‌تر است و ویژگی‌های پروبیوتیک بهتری نسبت به محصولاتی که در حال حاضر در بازار عرضه می شوند دارند حائز اهمیت می باشد (خزائی و همکاران، ۲۰۱۹). بنابراین در این مطالعه استراتژی‌های مناسب برای مشخصه‌یابی ویژگی‌های پروبیوتیکی سویه لاکتوباسلوس جدا شده از پنیر سنتی خیکی سمنان به عنوان گام اول به منظور افزوده شدن به غذاهای دارای کارکرد بهتر استفاده گردید.

مواد و روش ها

در این تحقیق از سویه *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* که در مطالعات قبلی (خزائی و همکاران، ۲۰۱۹) توسط گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان از پنیر سنتی سمنان جداسازی شده بود و بر اساس آنالیز ژنومی16s rRNA ، در بانک اطلاعاتی NCBI بلاست و با کد OK561873 ثبت شده بود، استفاده گردید. همچنین جهت کشت و شمارش باکتری‌های مورد مطالعه از محیط های کشت MRS agar، MRS broth و BHI agar استفاده شد. محیط‌ها طبق دستور شرکت تولید کننده آماده و توسط اتوکلاو سترون شدند (مرک، آلمان).

آزمایش غربالگری بر اساس قابلیت زنده ماندن در pH اسیدی

در این آزمون، مقاومت جدایه لاکتوباسیلوس نسبت به pH تعیین شد. محیط های MRS broth با pH ۱/۵ و ۲/۵ که توسط اسید هیدروکلریک تنظیم شدند، تهیه گردید. از کشت ۲۴ ساعته جدایه مورد مطالعه رقت تهیه شد با استفاده ازدستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۰۰ نانومتر رقتی که OD آن معادل ۰/۱ باشد مشخص گردید و محتویات این لوله تحت شمارش باکتریایی به روش کشت سطحی قرار گرفت. ۱۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته جدایه (10^8cfu/ml) با ۲۴۰ میکرولیتر MRS broth با pH های تنظیم شده در یک چاهک پلیت مخلوط شد و به مدت سه ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. در زمان‌های صفر و سه ساعت رقت‌های متوالی تهیه شد و در محیط MRS agar به‌صورت سطحی کشت داده شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در شرایط هوازی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و در نهایت با شمارش باکتریایی درصد قابلیت زنده ماندن سویه محاسبه شد(هاشمی و همکاران ۲۰۱۴).

آزمایش رشد در شرایط اسیدی و مقاومت و رشد به صفرا

توانایی رشد سویه‌ها در شرایط اسیدی در MRS broth در سه pH مختلف (بر اساس آزمایش غربالگری) ۲/۵، ۳/۵ و ۴/۵ بررسی شد و منحنی رشد با توجه به مقادیر OD به‌دست آمده در طول موج ۶۳۰ نانومتر و در طی ۲۴ ساعت توسط دستگاه الایزا ریدر (Biotech, USA) رسم گردید. به‌منظور تعیین مقاومت و رشد در حضور صفرا

[1] Auto-aggregation

[2] Co-aggregation

MRS broth حاوی ۰/۳، ۰/۵ و یک درصد oxgall استفاده شد. منحنی رشد با استفاده از قرائت OD_{630} نانومتر در ۲٤ ساعت توسط دستگاه الایزا ریدر (Biotech, USA) رسم گردید (تالابراگادا و همکاران ۲۰۱۸).

بررسی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس* در شرایط شبیه‌سازی شده‌ی معده‌ای و روده ای

پلت باکتریایی کشت ۲٤ ساعته (10^8cfu/ml) به وسیله سانتریوفیوژ (٦۰۰۰g) جدا و دو بار با بافر PBS شستشو داده شد؛ سپس در محلول‌های PBS با pH برابر با۲ و حاوی پپسین (۳ mg/ml) و Nacl (۰/۵٪) معلق شدند. بعد از گرم‌خانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های صفر و سه ساعت، شمارش کلونی‌های زنده با کشت در MRS agar انجام شد. بعد از ۳ ساعت، یک میلی‌لیتر از کشت مرحله قبل به نه میلی‌لیتر شیره‌ی روده‌ی حاوی یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر پانکراتین و صفرای ۰/۳ درصد در pH هشت اضافه شد و شمارش باکتری‌های زنده در زمان‌های صفر، دو و چهار ساعت انجام گردید (سرابی جماب و همکاران ،۱۳۹٦).

بررسی فعالیت ضد باکتریایی جدایه

جهت بررسی فعالیت ضدباکتریایی جدایه، از دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213* (بعنوان شاخص باکتری‌های گرم مثبت) و *اشریشیا کلی ATCC 35218* (بعنوان شاخص باکتری‌های گرم منفی) استفاده گردید. آزمایش به دو روش کشت نقطه‌ای روی آگار و انتشار در آگار با ایجاد چاهک صورت پذیرفت.

روش کشت نقطه‌ای روی آگار

از کشت ۲٤ ساعته سویه‌ی خالص *لاکتوباسیلوس* با کدورت نیم مک فارلند به‌صورت نقطه‌ای بر روی آگار MRS کشت داده شد و به مدت ۲٤ ساعت در ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد سپس به پلیت‌ها پنج میلی‌لیتر محیط آگار Brain Heart Infusion (BHI) نیمه جامد تلقیح شده با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی میکروارگانیسم‌های شاخص (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی*) با کدورت نیم مک فارلند افزوده شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری گردید. سپس ناحیه‌ی شفاف اطراف کلنی‌های لاکتوباسیل توسط نرم افزار Axio Vision Rel. 4.8 اندازه‌گیری شد. حضور ناحیه‌ی شفاف در اطراف کلونی نشان‌دهنده‌ی مهار میکروارگانیسم شاخص در اثر تولید ماده‌ی ضد میکروبی قابل انتشار در آگار بود (پن و همکاران ۲۰۰۹).

روش انتشار در آگار با ایجاد چاهک

در هر پلیت مقدار ۱۵ میلی‌لیتر آگار BHI مذاب تلقیح شده با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی میکروارگانیسم شاخص (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلای*) با کدورت نیم مک فارلند ریخته و پس از جامد شدن آگار با استفاده از پیپت پاستور استریل چاهک‌هایی با قطر شش میلی‌متر در آگار ایجاد گردید. کف چاهک با استفاده از آگار مذاب مسدود شده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوپر ناتانت بدست آمده از سانتریوفوژ کشت لاکتوباسیل در دور ۵۰۰۰، به چاهک افزوده شده و در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شد. قطر هاله‌ی شفاف اطراف چاهک با استفاده از نرم افزار Axio Vision Rel. 4.8 بر حسب میلی‌لیتر اندازه‌گیری گردید (هردیا-کاستروو همکاران ۲۰۱۵).

هیدروفوبیسیتی سطح سلولی باکتری‌ها

این پارامتر به‌وسیله‌ی اندازه‌گیری چسبندگی میکروبی به هیدروکربن‌ها ارزیابی می‌شود. در این مطالعه از هیدروکربن های زایلازین و n – هگزادکان تولوئن استفاده گردید. سلول‌های باکتریایی از کشت ۲٤ ساعته سانتریفیوژ و توده‌های سلولی جدا شدند. سلول‌ها دو بار با فسفات بافر سالین (PBS) شستشو داده شده و در سه میلی‌لیتر نیترات پتاسیم یک دهم مولار معلق شدند (غلظت سلولی نهایی در حدود 10^7 cfu/ml تنظیم شدند). جذب در ٦۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید (A_0). به‌منظور تشکیل یک سیستم دوفازی، یک میلی‌لیتر زایلازین به سوسپانسیون سلولی اضافه شد. بعد از گذشت ده دقیقه پیش‌گرمخانه‌گذاری

در دمای اتاق، سیستم دوفازی بوسیله ورتکس به مدت دو دقیقه مخلوط شده و سپس فاز آب و هیدروکربن ها بعد از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق جدا گردیدند. فاز آبی با دقت جدا شده و جذب آن در ۶۰۰ نانومتر (A_1) اندازه‌گیری شد. درصد هیدروفوبیسیتی سطح سلول (H%) با استفاده از فرمول زیر به‌دست آمد (گری گوریان و همکاران ، ۲۰۱۷).

$$H\ (\%) = (1-(A_1/A_0)) \times 100$$

در این معادله A_1 نشان دهنده جذب نوری بعد از بیست دقیقه و A_0 نشان دهنده جذب نوری اولیه می باشد .

آزمایش خودتجمعی و تجمع توام

ویژگی خودتجمعی سویه‌های پروبیوتیک می‌تواند ظرفیت اتصال سلول‌های باکتریایی به سلول‌های اپتلیال روده‌ای را تحت تاثیر قرار دهد و تجمع توام با پاتوژن‌ها می‌تواند از کلونیزاسیون پاتوژن‌ها در روده جلوگیری کند (راموس و همکاران، ۲۰۱۳).

چهار میلی‌لیتر از کشت ۲٤ ساعته حاوی 10^8 cfu/ml باکتری به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس و هموژن شده و سپس به مدت ٥ ساعت در دمای اتاق گرمخانه‌گذاری گردید و در فواصل زمانی یک ساعته یک دهم میلی‌لیتر از سوسپانسیون رویی برداشته و به یک لوله جدید حاوی ۳/۹ میلی‌لیتر PBS منتقل شد. سپس جذب ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد. درصد Auto-aggregation تا زمانیکه به عدد ثابتی برسد طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{Auto-aggregation}\ (\%) = 1-(A_t/A_0) \times 100$$

که A_t نشان‌دهنده جذب در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ٤ و ٥ ساعت است و A_0 جذب در زمان صفر است.

به منظور ارزیابی Co-aggregation حجم‌های برابر (۵۰۰ میکرولیتر) از سویه لاکتوباسیل و پاتوژن (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تایفی موریوم* *ATCC 14028*[1]) در محیط PBS مخلوط شده و در دمای اتاق گرمخانه‌گذاری شدند و مقادیر جذب A_{600} نانومتر در پنج ساعت گرمخانه‌گذاری اندازه‌گیری گردید. مقادیر Co-aggregation نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Co-aggregation}\ (\%) = [(A_{pa} + A_{pr})/2 - (A_{mix})] / A_{pa} + A_{pr}\ /2 \times 100$$

که A_{pa} نشان‌دهنده مقدار جذب نوری باکتری پاتوژن، A_{pr} مقدار جذب نوری پروبیوتیک و A_{mix} مقدار جذب نوری مخلوط پروبیوتیک و باکتری پاتوژن می‌باشد (گری گوریان و همکارن ، ۲۰۱۷) .

تجزیه و تحلیل آماری

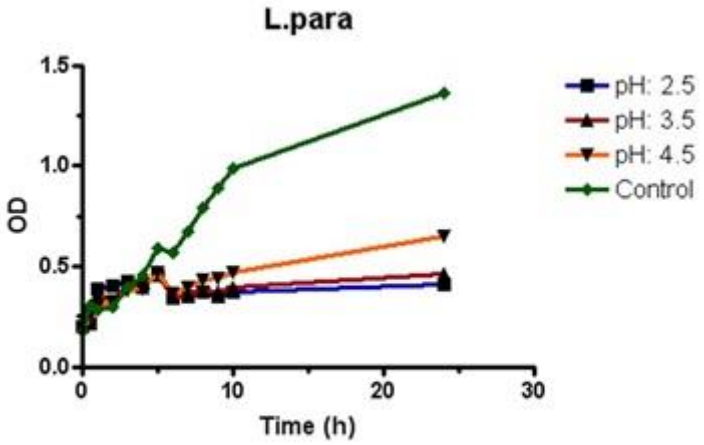
نمودارهای مربوط به رشد و زنده مانی باکتری مورد مطالعه با نرم افزار Graphpad Prism 4 ترسیم گردید و کلیه تحلیل های آماری بین لگاریتم تعداد باکتری‌ها در ساعات مختلف و همچنین شیب خط منحنی های رشد، با استفاده از نرم افزار SPSS 16 انجام گردید. جهت مقایسه‌ی میانگین داده‌های مختلف از آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شد. در ادامه از آزمایش دانکن جهت سنجش اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها استفاده گردید. در تمامی آنالیزهای آماری $P<0.05$ به‌عنوان شاخص معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

سنجش تحمل pH و رشد در شرایط اسیدی

بررسی زنده‌مانی در اسید در pH های ۱/٥ و ۲/٥ روی لاکتوباسیلوس جدا شده بررسی شد. در pH ۱/٥ هیچ رشدی مشاهده نگردید. در حالیکه در pH ۲/٥، شمار سلول‌های زنده ٦/۲۳Log cfu/ml گزارش شد و درصد زنده‌مانی مناسبی (۷۵/٥٪) را نشان داد. شکل ۱ نتایج رشد جدایه لاکتوباسیلوس در pH های مختلف(۲/٥ ،٤/٥،۳/٥) را نشان می‌دهد. مطابق نتایج جدایه سازگاری مناسبی در محیط‌های اسیدی نشان داد. بررسی نتایج نشان داد که میزان رشد بعد از گروه کنترل در pH= ٤/٥ از سایر گروه‌ها بیشتر بود (P<۰/۰٥) ولی اختلاف معناداری در سایر pH ها وجود نداشت.

[1] *Salmonella typhimorium*



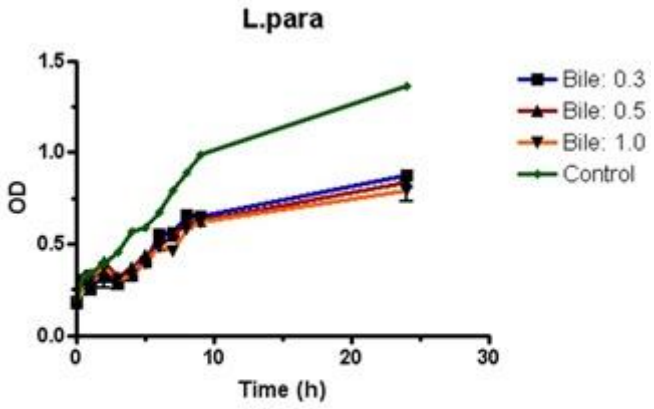
شکل۱- نتایج رشد جدایه *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در گروه های تیمار pH های مختلف و کنترل

Figure 1- Growth results of *Lactobacillus paracasei* isolate in different pH and control treatment groups

برای آن‌که یک باکتری به عنوان پروبیوتیک معرفی شود باید عوامل متفاوت را در آن مورد بررسی قرار داد. باکتری پروبیوتیک برای استقرار در روده ملزم به عبور از محیط‌های حاوی pH اسیدی در معده و املاح صفراوی در روده می‌باشد. همچنین توانایی سویه‌ها در مهار رشد پاتوژن‌ها می‌تواند دلیلی برای انتخاب آن سویه به عنوان پروبیوتیک باشد (تالابراگادا و همکاران، ۲۰۱۸). اثر pH معده بر زنده‌مانی باکتریایی و جلوگیری از کلونیزه شدن باکتری‌ها در روده کوچک به خوبی بررسی شده است؛ بنابراین هر ارگانیسم پروبیوتیک که در معده زنده می‌ماند باید تحمل اسیدی بالایی داشته باشد. مقاومت بالای بعضی باکتریها نسبت به pH پایین می‌تواند به علت تولید ترکیباتی مانند پلی‌ساکاریدها باشد که مانع از اثر اسید روی غشای سلول آن‌ها می‌شود (برکت و همکاران ۲۰۱۱). این نتایج همانند نتایج به دست آمده در مطالعات مربوطه قبلی است که در آن‌ها سویه‌های لاکتوباسیل حتی بعد از مواجهه با مقادیر pH ۲ تا ٤ زنده ماندند؛ اما در مقادیر پایین‌تر pH، این زنده‌مانی کم شد. پذیرفته شده است که هضم باکتری‌های پروبیوتیک با غذا یا محصولات لبنی pH معده را تا pH ۳ یا بیشتر افزایش می‌دهد. (میشرا و پراساد، ۲۰۰۵). ساهادوا و همکاران در سال ۲۰۱۱؛ نشان دادند که زنده‌مانی تمام جدایه‌ها به طور معنی‌داری در pH ۲ نسبت به pH ۳ و ۷ کاهش می‌یابد. در مطالعه طباطبایی یزدی و همکاران در سال ۱۳۹٤، تاثیر pH بر سطح زنده‌مانی ۵۵ جدایه به دست آمده از کیمچی مورد بررسی قرار گرفت که در این مطالعه درجه زنده‌مانی اکثر سویه‌های لاکتوباسیل را در حدود کمتر از ۵۰ درصد در pH ۲ گزارش کردند.

بررسی مقاومت به نمک های صفراوی و شیره شبیه سازی شده معده-روده ای

در این تحقیق با توجه به نتایج رشد در غلظت‌های مختلف صفرا (۰.۳، ۰.۵ و یک درصد) (شکل۲) *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* مقاومت و رشد مناسبی را نشان داد. زمان تاخیر رشد کمتر از سی دقیقه مشاهده شد که مقاوم بودن جدایه‌ها به غلظت‌های مختلف صفرا را نشان می دهد. هیچگونه اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف ملاحظه نشد.



شکل ۲- نتایج مقاومت و رشد جدایه *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در گروه های تیمار نمک های صفراوی مختلف و کنترل

Figure 2- Results of resistance and growth of *Lactobacillus paracasei* isolate in different concentration of bile salt and control groups

در مطالعه حاضر *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* مقاومت به صفرا و رشد زیاد در محیط‌های صفراوی را در سه غلظت مورد مطالعه املاح صفراوی نشان داد. این مشاهدات سازگار با مطالعه جمالی و همکاران بیان کردند که سویه‌های لاکتوباسیلوس اسیدهای صفراوی را به خوبی تحمل می‌کنند. نشان داده شده است که تحمل صفرا به وسیله پروبیوتیک به غلظت صفرا و نوع سویه بستگی دارد و سطوح مقاومت در محدوده غلظت‌های صفرا ۰/۱۲۵ تا ۲ درصد است (جمالی سراب و همکاران، ۲۰۱۱). در مطالعه‌ی هاشمی و همکاران در سال ۲۰۱٤، پتانسیل پروبیوتیکی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* جدا شده از پنیر سنتی کردی بررسی شد. در این مطالعه تمام سویه‌های *لاکتوباسیلوس* مورد آزمون مقاومت نسبتا بالایی به املاح صفراوی داشتند (سرابی جماب و همکاران، ۱۳۹٦).

برای تعیین اثر مواجهه طولانی‌مدت سویه لاکتوباسیلوس با pH اسیدی شیره معده سنجش زنده‌مانی به مدت سه ساعت در شرایط In vitro انجام شد. نتایج مقاومت جدایه در جدول یک مشخص گردید. یافته‌های حاصل از آزمایش نشان داد که در pH ۲ و بعد از گذشت سه ساعت یک کاهش تقریبا برابر با یک و نیم سیکل لگاریتمی نشان داده شد و سپس در شرایط محیط روده یک روند افزایشی رشد سویه به دلیل افزایش pH محیط مشاهده گردید. اختلاف معنی داری بین داده ها مشاهده نشد.

جدول ۱- میانگین نتایج زنده مانی جدایه لاکتوباسیلوس در شرایط شبیه‌سازی شده معده‌ای و روده‌ای

Table 1- Mean survival results of Lactobacillus isolate in simulated gastric and intestinal conditions

Strian	ph = 3 log cfu/ml		ph = 8 log cfu/ml	
	H_0	H_3	H_2	H_4
L. paracasei	8.25±0.8	6.71±0.8	7.07±0.4	7.7±0.4

(H_0 و H_3 در pH=3 نتایج در زمان صفر و طی سه ساعت مشابه مدت زمان ماندن غذا در معده)

(H_2 و H_4 نتایج زنده مانی در pH=8 در ادامه مرحله قبل، طی دو ساعت و چهار ساعت مشابه مدت زمان ماندن غذا در روده)

باکتری‌ها با مکانیسم‌های مختلفی شرایط pH پایین را تحمل می‌کنند که یکی از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها برای گونه‌های لاکتوباسیل سیستم F0F1-ATPase است (کانها و همکاران ۲۰۱۳). تاکتالی و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند ویژگی مقاومت به شرایط اسیدی وابسته به سویه بوده و برای هر باکتری به صورت مجزا باید مورد بررسی قرار بگیرد. مقاومت باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی در برابر صفرا گویای رفتار واقعی آن‌ها در دستگاه گوارش نیست. در مطالعه ماراگکوداکی و همکاران (۲۰۰۶) از بین لاکتوباسیل های جدا شده فقط سویه‌های کمی قادر به زنده ماندن در pH= ۱ اسید یا در حضور پپسین بودند در حالی که همه آن‌ها در برابر پانکراتین و نمک های صفراوی آسیبی ندیدند که با یافته‌های حاصل از این پژوهش همخوانی داشت. در بررسی مطالعه فرس و همکاران بر روی پروتئین لایه‌ی سطحی s گونه ای از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دریافتند که* پروتئین لایه سطحی این باکتری به پپسین و پانکراتین مقاوم بوده بنابراین زنده‌مانی بالایی در محیط شبیه سازی شده روده و معده دارد که با نتایج حاصل از این پژوهش هم راستا است.

مطالعه سرابی جماب و همکاران در سال ۱۳۹۶ نشان داد که در pH پایین‌تر معده (۱/۵) در مقایسه با pH بالاتر (۲/۵) زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک؛ *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[1] و *بیفیدیوباکتریوم بیفیدیوم*[2] بسیار کم می‌باشد که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی داشت. همچنین تعداد باکتری *بیفیدیوباکتریوم بیفیدیوم* به محض ورود به روده در مقایسه با سایر زمان‌های حضور در روده کمترین مقدار بود. بیشترین تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* پس از ۳۰ دقیقه حضور در روده مشاهده شد. تعداد باکتری‌های ورودی به روده از معده با pH ۱/۵ در تمام زمان‌ها صفر بوده است اما تعداد باکتری‌های ورودی به روده از معده با pH ۲/۵ در زمان ۳۰ دقیقه بیشترین مقدار بوده است.

نتیجه بررسی فعالیت آنتاگونیستی جدایه *لاکتوباسیوس پاراکازئی*

جلوگیری از رشد به وسیله ارگانیسم‌های بیماری‌زا به عنوان یکی از ویژگی‌های اصلی باکتری‌های پروبیوتیک محسوب می‌شود. نتایج اثر آنتاگونیستی جدایه لاکتوباسیل با دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلای* به روش کشت نقطه‌ای و چاهک در جدول ۲ مشخص شده‌اند. در روش کشت نقطه‌ای جدایه لاکتوباسیلوس ممانعت واضحی را در مقابل دو باکتری بیماری‌زای بررسی شده نشان داد. نتایج نشان داد که اثر مهار کنندگی رشد علیه پاتوژن‌های مورد مطالعه مربوط به *لاکتوباسیوس پاراکازئی* با قطر هاله عدم رشد ۰/۱۳۹ ± ۲/۹۴میلی‌متر در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* ۰/۱۳۷ ± ۲/۵۹ میلی‌متر در برابر اشیرشیاکلی بود. همچنین اختلاف معناداری در اثر آنتاگونیستی جدایه لاکتوباسیل برعلیه باکتری گرم مثبت و منفی وجود نداشت. در روش چاهک نتایج اثر آنتاگونیستی ترکیبات مهار کننده رشد (همانند تولید باکتریوسین، پراکسید هیدروژن و اسید های آلی) توسط جدایه لاکتوباسیلوس بر علیه پاتوژن های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلای* در جدول ۲ نشان داده شده است. بیشترین اثر مهار کنندگی رشد علیه پاتوژن های مورد مطالعه مربوط به *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله عدم رشد ۱/۴۵ میلی‌متر بود.

[1] *Lactobacillus rhamnosus*

[2] *Bifidobacterium bifidum*

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از کشت *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* بر علیه باکتری های بیماری زا (بر حسب میلی متر) به روش کشت چاهک و نقطه ای

Table 2- Mean diameter of growth inhibition zone from *Lactobacillus paracasei* culture against pathogenic bacteria (in millimeters) by well diffusion and spot agar methods

Methods	*S. aureus* (mm)	*E. coli* (mm)
Well diffusion	1.45±0.04	**0.95±0.01**
Spot agar	2.94±1.39	**2.59±1.37**

امروزه به علت اینکه مقاومت‌های دارویی در بعضی از باکتری ها روز به روز در حال افزایش است از مهار رقابتی باکتری‌های پروبیوتیک از جمله اسید لاکتیک باکتری‌ها خصوصا لاکتوباسیل‌ها برای جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا استفاده می‌شود (تاج ابادی ابراهیمی و همکاران ۱۳۸۸، میثاقی و همکاران ۲۰۱۶ و پارسایی مهر و همکاران ۲۰۱۷). به همین منظور در این پژوهش به فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیل جدا شده علیه دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* پرداخته شد. نتایج حاصل از روش چاهک نشان داد جدایه مورد مطالعه توانایی خوبی علیه سویه‌های بیماری‌زا را داشته است. بیشترین هاله عدم رشد هم در روش چاهک و هم در روش نقطه‌ای مربوط به *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱/۴۵ میلی متر) بوده است. در فعالیت آنتاگونیستی جدایه مورد مطالعه [redacted] هر دو پاتوژن، اختلاف معنی‌داری دیده نشد. ای[redacted]ژگی [redacted]ستگی به ویژگی‌های ذاتی سویه پروبیوتی[redacted]سویه پاتوژن دارد (کولادوو همکاران، ۲۰۰۷). هم[redacted] با این مطالعه، در مطالعه هاشمی و همکاران تمام س[redacted]های لاکتوباسیلوس ممانعت واضحی را در مقابل دو [redacted]ی پاتوژن بررسی شده نشان دادند و تفاوت قابل توجهی بین سویه‌های پروبیوتیک در توانایی برای جلوگیری از باکتری‌های بیماریزا وجود نداشت. در مطالعه‌ی برومبرگ و همکاران در سال ۲۰۰٤، فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از فراورده‌های تخمیری گوشتی بررسی شد که از ٦١ درصد باکتری جداشده تنها ۳۱ درصد قادر به مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا روی محیط بودند. ریپامونتی و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی توانایی سه سویه جدا شده علیه عوامل بیماریزا شامل *اشریشیا کلی* ATCC 25922، *سالمونلا تایفی‌موریوم* ATCC 14028[1] و *لیستریا مونوسایتوژنز*[2] ATCC7644 پرداختند و مشاهده کردند که دو باکتری *لاکتوباسیلوس انیمالیس*[3] و*لاکتوباسیلوس کازئی* زیر گونه پاراکازئی[4] اثر مهاری مشخصی روی این عوامل بیماری‌زا دارند. در مطالعه گوتیرز-کورتس و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی فعالیت آنتاگونیستی برخی سویه های پروبیوتیک مانند *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[5]، *لاکتوباسیلوس کازئی*[6] و *پدیوکوکوس اسیدیلاکتیس*[7] در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *لیستریا مونوسایتوزنز* ، مشخص گردید که سویه *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* اثر مهاری بیشتری را بر *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به سایر پاتوژن‌ها نشان داد و همچنین اختلاف معناداری در اثر مهاری علیه باکتری های گرم مثبت و منفی مشاهده نگردید که با نتایج این مطالعه هم خوانی داشت. همچنین در برخی مطالعات عدم کفایت مناسب لاکتوباسیل ها در مهار باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری های گرم مثبت گزارش شده است (پیرد و همکاران ۱۹۹۰ و روایی و همکاران ۲۰۱۳).

[redacted]

[1] *Salmonella typhimurium*
[2] *Listeria monocytogenes*
[3] *L. animalis*
[4] *L. casei subsp. Paracasei*
[5] *L. plantarum*
[6] *L. casei*
[7] *P. acidilactis*

بررسی آزمایشات خود تجمعی، تجمع توام و هیدروفوبیسیتی جدایه لاکتوباسیلوس

مطابق با نتایج جدول ۳، جدایه لاکتوباسیلوس پاراکازئی درصد بالایی از ویژگی‌های خودتجمعی را نشان داده و میانگین درصد آن طی پنج ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۹۲/٤٥ درصد بوده است. همچنین تجمع توام سویه لاکتوباسیلوس با پاتوژن‌ها (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تایفی موریوم*) نیز بررسی گردید و نتایج به صورت درصد کاهش بعد از چهار ساعت در جذب سوسپانسیون مخلوط نسبت به سوسپانسیون انفرادی بیان شده و طبق نتایج جدول، سویه آزمایش شده تجمع توام قابل *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داده است (جدول۳). همچنین نتایج هیدروفوبیسیتی یا آبگریزی جدایه لاکتوباسیلوس پاراکازئی در جدول ۳ نشان داده که این سویه می‌تواند ویژگی آبگریزی مناسبی داشته باشد (۵۷/۸۲ درصد).

جدول ۳- میانگین درصد توانایی جدایه *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در خود تجمعی، هیدروفوبیسیتی و تجمع توام با پاتوژن ها

Table 3- Mean percentage of *lactobacillus paracasei* ability in auto- aggregation, hydrophobicity and co-aggregation with pathogens

Strian	aggregation(%)	H*(%)	Coaggregation(%)	
			S.typhimurium	*S.aureus*
L. paracasei	92.45±1.3	57.82±0.11	39.04±0.11	**41±0.12**

*Hydrophobicity

خودتجمعی بین میکروارگانیسم‌ها با سویه یکسان یا بین گونه‌ها و سویه‌های مختلف پاتوژن‌ها (هم تجمعی) مانند توانایی آن‌ها برای جابجا کردن پاتوژن‌ها یک ویژگی مهم سویه‌ی پروبیوتیک است و می‌توانند مزیت مهمی نسبت به ارگانیسم‌هایی باشد که این توانایی را ندارند و به آسانی از محیط دستگاه گوارش هضم می‌شود. واکنش متقابل سویه‌های پروبیوتیک با فلور طبیعی روده کلیدی برای موفقیت ذاتی ارگانیسم‌ها در ایجاد کلون و باقی ماندن طولانی‌مدت است. پیشنهاد شده است که تجمع توام سویه‌های پروبیوتیک آن‌ها را قادر می‌کند یک سد فیزیکی- شیمیایی ایجاد کنند که از کلون زایی باکتری‌های پاتوژن جلوگیری می‌کنند. همچنین خودتجمعی یا ایجاد توده ممکن است اساسا باعث افزایش ظرفیت ایجاد کلون توسط لاکتوباسیلوس‌ها در محیط‌هایی شود که زمان سکونت در آن‌ها کوتاه است؛ همانند لوله گوارش. فرض شده است که ترکیب شدن سویه‌های پروبیوتیک می‌تواند باعث بهبود فواید سلامتی در مقایسه با سویه‌های تنها شود. (کولادو و همکاران ۲۰۰۷) .

در ارتباط با ویژگی تجمع توام سویه مورد مطالعه، درصد تجمع توام بالایی را با *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد ($p<0.05$) که این ویژگی‌ها بستگی به ویژگی های ذاتی سویه‌های پروبیوتیک، سویه پاتوژن و زمان انکوباسیون دارد (پروبهوراجشوار و همکاران، ۲۰۱۷). هم‌راستا با مطالعه اخیر، با بررسی ۲۵ گونه از لاکتیک اسید باکتریا جدا شده از محصولات لبنی و سبزیجات تخمیری، سه سویه‌ی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* MR-1980، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* INRA-2010-H11 و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* JM-2010 به ترتیب ۵۳/۳، ۷۰/۵ و ٦۲/۳ درصد توانایی خودتجمعی داشتند (گریگوریان و همکاران ۲۰۱۷). در مطالعه هاشمی و همکاران در سال ۲۰۱٤، تمامی سویه‌های لاکتوباسیوس‌های جدا شده از پنیر سنتی کردی درصد بالایی از خود تجمعی را نشان دادند که درصد آن بعد از ٤ساعت انکوباسیون ۷۷/۳ تا ۸۸/۲ بود ضمنا، تمام سویه‌ها تجمع توام قابل توجهی با *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند (۲۹.٤ درصد) که نتایج حاصله، هم راستا با این مطالعه بود (هاشمی و

همکاران ۲۰۱٤). در سال ۲۰۰۳ در مطالعه‌ای که توسط ساسکوویک و همکاران انجام گرفت، بررسی تجمع و چسبندگی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* M 92 به سلول‌های اپتلیال ایلئوم خوک در محیط آزمایشگاه و اثر پروتئین‌های سطحی سلول به تجمع خود به خود و چسبندگی این سویه انجام گرفت. این نتایج نشان داد که رابطه‌ای بین توانایی تجمع خودبه خودی و چسبندگی *لاکتوباسیلوس* وجود دارد که مرتبط با ترکیبات پروتئینی موجود در سطح غشای سلول باکتری می‌باشد. این ویژگی سبب توانایی جایگیری لاکتوباسیل در لوله گوارش انسان می‌شود که یک تشخیص مهم در انتخاب سویه‌های پروبیوتیک است (سوسکوویک و همکاران ۲۰۰۳).

آبگریزی سلول یکی از فاکتورهایی است که می‌تواند در چسبیدن سلول‌های باکتریایی به بافت میزبان نقش داشته باشد. این ویژگی می‌تواند یک مزیت و یک فاکتور مهم برای حفظ باکتری در لوله گوارش باشد. زمانی‌که آبگریزی سلول افزایش پیدا می‌کند به این معنی است که مولکول‌های آبگریز در سطح سلول وجود دارند همانند پروتئین‌های سطحی، پروتئین‌های غشا پلاسمایی و لیپیدها. برای ایجاد کلون، ویژگی‌های آبگریزی ضروی است. (سوسکوویک و همکاران ۲۰۰۳) در این مطالعه سویه جدا شده ویژگی‌های آبگریزی خوبی را با زایلن نشان داد (٥٧/٧٤٪). در مطالعه هاشمی و همکاران مقدار محاسبه شده برای ابگریزی بین ٤٣/٦ تا٨٢/٨ درصد بود نتایج همچنان نشان می‌دهد که آب گریزی دیواره‌ی سلول سویه‌های جدا شده به طور معنی داری بیشتر از سویه‌های مرجع بود به علاوه *لاکتوباسیوس پلانتاروم* LP3 بیشترین میزان آب گریزی را دارد. در راستای این مطالعه درصد هیدروفوبیستی ٦ لاکتوباسیوس بررسی شده بین ۲۹/٥ تا ۷۷/٤ بود (انوارعبدالله و همکاران ۲۰۰۱٤). در مطالعه‌ای از ٥١ جدایه لاکتوباسیوس از پنیر برزیلی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (٦٠٪/٩٨) بالاترین توانایی هیدروفوبیستی را داشتند که با پژوهش های حاصل از این مطالعه همخوانی دارد اما سایر جدایه ها هیدورفوبیسیتی کمتر از ١/٥٪ را نشان دادند (راموس ۲۰۱۳). هیدروفوبیسیتی به فاکتورهای متعددی از قبیل نیروی واندروالس، حرکت براونی، بار الکتریکی سطح و نیروی گرانش بستگی دارد. لذا درمورد باکتری باید به صورت مجزا این ویژگی بررسی گردد (وسیعی و همکاران ۲۰۱۹). همچنین، وجود ماده (پروتئین گلیکول) در سطح سلول منجر به آبگریزی بالاتر می‌شود در حالی که سطح آبدوست با حضور پلی‌ساکارید همراه است(پلتیا و همکاران ۱۹۹۷).

نتیجه گیری

در این تحقیق، سویه جداسازی شده از پنیر سنتی سمنان، ویژگی های پروبیوتیک مطلوب را در شرایط آزمایشگاهی نشان داد . بنابراین پیشنهاد می‌شود این جدایه به عنوان سویه جدید پروبیوتیک در صنایع غذایی می تواند کاندیدی مناسبی برای آزمایشات تکمیلی برون تنی[1] بیشتر و تحقیقات درون تنی[2] جهت محرز شدن مزایای بالقوه سلامتی محسوب گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه سمنان که با تامین اعتبار لازم امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می شود.

[1] In vitro

[2] In vivo

منابع مورد استفاده

سیده محبوبه سادات رسول، لیلا ناطقی، علیرضا شهاب لواسانی ، سید حسین استیری. تاثیر خمیر ترش حاوی لاکتوباسیوس پاراکازئی و فرمنتوم بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ماندگاری نان بربری نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی (۹۸. ۲(۱۱).

تاج آبادی ابراهیمی م، حجازی م ا، غفاری ر و جعفری پ، ۱۳۸۸، توانایی آنتاگونیسم لاکتوباسیل های مقاوم به اسید و صفرا جدا شده از محصولات لبنی، مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک، ۱۲(۲)، ۱۷-۲۷.

سرابی جماب م، رهنما وثوق پ، کته شمشیری م و کاراژیان ر، ۱۳۹۶، زنده‌مانی باکتری‌های *لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بعنوان باکتری های پروبیوتیک شاخص در مدل شبیه‌سازی شده معده ای و روده ای، علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۴ (۶۸) ،۳۴۰-۳۳

طباطبایی یزدی ف، وسیعی ع، علیزاده بهبهانی ب و مرتضوی ع، ۱۳۹۴، بررسی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده از کیمچی تولیدشده در ایران، مجله دانشگاه علوم پزشکی قم، ۹ (۵) ،۱۱-۲۲

نوشاد م، ، علیزاده بهبهانی ب و حجتی م، ۱۴۰۰، بررسی ویژگیهای پروبیوتیکی و تکنولوژیکی باکتریهای اسیدلاکتیک جدا شده از دوغ محلی، نشریه پژوهش های صنایع غذایی، ۳۱(٤) ۱۶۹ -۱۸۶

Abdullah A, 2014. Adhesion, Autoaggregation and Hydrophobicity of Six Lactobacillus Strains. British Microbiology Research Journal 4(4):381-391

Argyri A A, Zoumpopoulou G, Karatzas KA G, Tsakalidou E, Nychas G J E, Panagou E Z, and Tassou C C, 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. Food *microbiology 33*(2): 282-291.

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

Bove P, Gallone A, Russo P, Capozzi V, Albenzio M, Spano G, and Fiocco D, 2012. Probiotic features of *Lactobacillus plantarum* mutant strains. Applied microbiology and biotechnology *96*(2): 431–441.

Bromberg R, Moreno I, Zaganini CL, Delboni RR, and Oliveira JD, 2004. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. Brazilian Journal of Microbiology 35(1-2): 137-144.

Collado MC, Meriluoto J, and Salminen S, 2007. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. Letters in applied microbiology 45(4): 454–460.

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

Frece J, Kos B, Svetec IK, Zgaga Z, Mrsa V, Suskovic J, 2005. Importance of S- layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. Journal of applied Microbiology 98(2): 285-292.

Gao D, Gao Z, and Zhu G, 2013. Antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* via activation of transcription factor Nrf2. Food & function *4*(6): 982–989.

Grigoryan S, Bazukyan I, and Trchounian A, 2017. Aggregation and Adhesion Activity of Lactobacilli Isolated from Fermented Products in Vitro and In Vivo: a Potential Probiotic Strain. Probiotics and Antimicrobial Protection DOI 10.1007/s12602-017-9283-9.

Gutiérrez-Cortés C, Suárez H, Buitrago G, and Díaz-Moreno C, 2017. Isolation and evaluation of the antagonist activity of lactic acid bacteria in raw cow milk. Agronomía Colombiana 35(3), 357-364

Hashemi SMB, Shahidi F, Mortazavi SA, Milani E, and Eshaghi Z, 2014. Potentially probiotic Lactobacillus strains from traditional Kurdish cheese. Probiotics and antimicrobial proteins 6(1): 22-31.

Khazaei M, M Parsaeimehr M, Jebellijavan A, Staji H, 2019. The isolation and identification of dominant lactic acid bacteria by the sequencing of the 16S rRNA in traditional cheese (Khiki) in semnan, Iran. Journal of Human, Environment and Health Promotion 5 (1): 15-20.

Liong MT, and Shah NP, 2005. Optimization of cholesterol removal by probiotics in the presence of prebiotics by using a response surface method. Applied and environmental microbiology 71(4): 1745-1753.

Matejčeková Z, Liptáková D, Spodniaková S, and Valík, Ľ, 2016. Characterization of the growth of *Lactobacillus plantarum* in milk in dependence on temperature. Acta Chimica Slovaca, 9(2): 104-108.

Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, and Tsakalidou E, 2006. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. International Dairy Journal, 16(3): 189-199.

Misaghi A, Parsaeimehr M, Akhondzadeh A, Zahraee Salehi T, 2016. The inhibitory effects of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus* and Lactobacillus paracasei isolated from yoghurt on the growth and enterotoxin A gene expression. Iranian Journal of Veterinary Medicine 11 (2): 191-201.

Mishra, V, and Prasad, D. N, 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. International Journal of Food Microbiology 103(1): 109-115.

Monteagudo-Mera A, Rodríguez-Aparicio L, Rúa J, Martínez-Blanco H, Navasa N, García-Armesto M R., and Ferrero MÁ, 2012. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. Journal of Functional Foods 4(2): 531-541.

Orlando A., Refolo MG, Messa C, Amati L, Lavermicocca P, Guerra V, and Russo F, 2012. Antiproliferative and proapoptotic effects of viable or heat-killed *Lactobacillus paracasei* IMPC2. 1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in HGC-27 gastric and DLD-1 colon cell lines. Nutrition and cancer 64(7): 1103-1111.

Pan X, Wu T, Zhang L, Cai L, Song Z, 2009. Influence of oligosaccharides on the growth and tolerance capacity of lactobacilli to simulated stress environment. Letter in applied Microbiology 48(3): 362-367.

Parsaeimehr M, Azizkhani M, Jebelli Javan A, 2017. The inhibitory effects of 2 commercial probiotic strains on the growth of Staphylococcus aureus and gene expression of enterotoxin A. International Journal of Enteric Pathogens 5 (3): 70-75.

Parsaeimehr M, Staji H, Jebellijavan, A, Salimi A, Arab F, Faraki A, 2019. Study of chemical and microbial characteristics of camel raw milk and identification of dominant flora of lactic acid bacteria by PCR method in Semnan. Journal of Food Hygiene 9 (35) DOI: 10.30495/JFH.2019.669363.

Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, Bouttier S, Bourlioux P, and Bellon-Fontaine MN 1997. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. casei, *Lactobacillus paracasei* subsp. paracasei, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. Applied and Environmental Microbiology 63(5): 1725-1731.

Piard JC, Delome F, Giraffa G, Commissaire J, Desmazeaud MJ, 1990. Evidence for a bacteriocin produced by Lactococcus lactis CNRZ 481. Netherlands Milk Dairy Journal 44: 143-158.

Prabhurajeshwar C, Chandrakanth K, 2019. Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic Lactobacilli strains isolated from commercial yoghurt. Clinical Nutrition Experimental 23: 97e115

Prabhurajeshwar C, and Chandrakanth.RK, 2017. Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. Biomedical journal 40(5): 270-283

Priscilia Y, Heredia-Castro, Mendez-Romero J, Hernandez-Mendoza A, Acedo-Felix E, Aaron F, Gonzalez-Cordova AF, Vallejo-Cordoba B, 2015. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by Lactobacillus spp. isolated from artisanal Mexican cheese. Journal of dairy science 98(12): 8285-93.

Ramos MA, Weber B, Gonçalves JF, Santos GA, Rema P, and Ozório RO, 2013. Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss), Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular&integrative physiology 166(2): 302–307.

Ravaei A, Heshmati poor Z, Zahraei Salehi T, Ashrafi Tamai I, Masood Ghane2 and Derakhshan pour J. 2013. Evaluation of Antimicrobial Activity of Three Lactobacillus spp. against Antibiotic Resistance *Salmonella typhimurium* r2. Advanced Studies in Biology 5 (2) :61 - 70

Schillinger U, and Lücke FK, 1989. Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. Applied and environmental microbiology 55(8): 1901-1906.

Smokvina T, Wels M, Polka J, Chervaux C, Brisse S, Boekhorst, J, and Siezen RJ. 2013. *Lactobacillus paracasei* comparative genomics: towards species pan-genome definition and exploitation of diversity. PloS one 8(7).

Suskovic S, Simpraga M, Frece J, Matosic S, 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92. Journal of applied Microbiology 94(6): 981-7.

Tokatlı M, Gülgör G, Bağder Elmacı S, Arslankoz İşleyen N and Özçelik F, 2015. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. BioMed Research International.e ID 315819, 8 pages.

Tallapragada P, Rayavarapu B, Purushothama Rao P, Naige Ranganath N, Pogakul Veerabhadrappa P, 2018. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 16: 357–362.

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

Verdenelli MC, Ghelf, F, Silvi S, Orpianesi C, Cecchini C, and Cresci A, 2009. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. European journal of nutrition 48(6), 355–363.

Ward LJ, Timmins MJ, 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacllus paracasei* and *Lactobacillus rhamnousus* by polymerase chain reaction. Letter in applied Microbiology 29(2): 90-92.

Journal of Food Research, 2022,32(4):57-73
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)

DOI: 10.22034/FR.2022.48699.1809

Investigation of probiotic properties of *lactobacillus paracasei* isolated from traditional cheese in Iran

N Golbaghi[1], M Parsaeimehr[2*], A Jebellijavan[3] and A Salimi[2]

Received: October 29, 2021 Accepted: May 15, 2022
[1]DVM Graduated, Food Hygiene Department, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
[2]Assistant Professor, Food Hygiene Department, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
[3] Associated Professor, Food Hygiene Department, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
[*]Corresponding Author: Email: mparsaei@semnan.ac.ir

Introduction: Over the past few decades, there has been a surge in interest in the isolation of novel Lactobacillus probiotic strains that exert beneficial effects in the host gastrointestinal tract (GI). probiotics are ‘‘living micro-organisms, which upon ingestion in certain numbers, exert health benefits beyond inherent basic nutrition’’. Most probiotic microorganisms are lactic acid bacteria (LAB), among them lactobacilli represent one of the major microbial groups. They have been introduced in a wide range of food products, including yogurts, cheese and other dairy products as well as non-dairy products, such as fruit juices and fermented sausages. (Bao et al., 2010). In order for a probiotic strain to exert its beneficial effect on the host, it has to be able to survive passage through the host’s digestive tract. So far, research has mainly focused on strains’sensitivity towards low pH, proteolytic enzymes and bile salts. It is considered that the ability of Lactobacillus strains to adhere to the mucosal surfaces of the intestine before they can exert their beneficial effects has long been one of the most commonly encountered criteria for the selection of probiotic strains (Gao et al., 2013). Auto aggregation ability and surface hydrophobicity of bacteria are two independent traits, and their determination has been proposed as an indirect method for evaluating the adhesion ability of bacteria. Also, the ability to co aggregate with other bacteria such as pathogens may form a barrier that prevents colonization by pathogenic microorganisms (Collado et al., 2007). The objective of this study was to evaluate the in vitro probiotic potential of the Lactobacillus strain isolated from Semnan traditional cheese (Khiki), and could therefore be potentially used as novel probiotic strain in the food industry.

Material and methods: In this study, the probiotic potential of Lactobacillus paracasei OK561873 isolated from Semnan traditional cheese in previous study by the Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University was investigated. The isolated bacterium was sequenced based on the 16s rRNA genome and was confirmed as *Lactobacillus paracasei* confirmed in the BLAST database and registered as a new strain in the NCBI gene bank with code OK561873.Then, to evaluate the resistance of the Lactobacillus isolates to pH ,10 µl of the 24-hour culture of isolate (10^8 CFU / ml) was mixed with 240 µl of MRS broth at pH adjustments (1.5 and

2.5) in a microwell plate and incubated for 37 h at 37 ° C. Serial dilutions were prepared at 0 and 3 hours and cultured by surface plate in MRS agar medium and incubated for 24 to 48 hours in aerobic conditions at 37 ° C. Finally, the survival percentage of the strain was calculated by bacterial counting. The ability of the strain to grow under acidic conditions in MRS broth at three different pHs 2.5, 3.5 and 4.5 (based on screening experiments) was evaluated, and the growth curve according to the OD values obtained at 630 nm was drawn by ELISA reader (Biotech, USA) during 24 hours. MRS broth containing 0.3, 0.5 and 1% oxgall was used to determine resistance and growth in the presence of bile. The growth curve was drawn using OD630 nm reading in 24 hours by ELISA reader (Biotech, USA). The 24-hour cultured bacterial pellet (10^8 CFU / ml) was separated by centrifugation (g6000) and washed twice with PBS buffer; then they were suspended in PBS solutions with a pH of 2 and containing pepsin (3 mg/ml) and NaCl (0.5%). After incubation at 37 ° C, live colonies were counted by culture in MRS agar at 0, 60, 90 and 180 minutes. After 3 hours, 1 ml of the previous stage culture was added to 9 ml of intestinal juice containing 1 mg/ml of pancreatic and bile of 0.3% at pH eight, and live bacteria were counted at 0, 2 and 4 hours. To evaluate the antibacterial activity of the isolate, two bacteria, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (as an indicator of gram-positive bacteria) and *Escherichia coli* ATCC 35218 (as an indicator of gram-negative bacteria) were used. The experiment was performed by two methods of spot agar and well diffusion. The hydrophobicity test, is evaluated by measuring the microbial adhesion to hydrocarbons. Auto-aggregation property of probiotic strain can affect the binding capacity of bacterial cells to intestinal epithelial cells, and co-aggregation with pathogens can prevent the colonization of pathogens in the intestine. In brief, four milliliters of the 24-hour culture containing 10^8 CFU / ml of bacteria were vortexed and homogenized for 10 seconds and then incubated for 5 hours at room temperature. At one-hour intervals, one-tenth of a ml suspension was removed and placed in a new tube containing 3.9 ml of PBS was transferred. Then the absorption of 600 nm was measured using a spectrophotometer.

Results and discussion: the viability was evaluated at pH 1.5 and 2.5 on isolated Lactobacillus. No growth was observed at pH 1.5. While at pH 2.5, the number of viable cells was reported to be 6.23 log cfu / ml and showed a good survival rate (75.5%). According to the growth results of Lactobacillus isolate at different pH (2.5, 3.5, 4.5) showed that the growth rate, after the control group, at pH = 4.5 was higher than other groups ($P < 0.05$) But there was no significant difference in other pHs. *Lactobacillus paracasei* showed good resistance and growth at different concentrations of bile. Growth retardation time of few than 30 minutes was observed, indicating that the isolates were resistant to different concentrations of bile. No significant differences were observed between treatment groups. The results of isolate resistance in the simulated conditions of gastric and intestinal juice showed that at pH 2 and after three hours, the strain survived and only a reduction equivalent to one and a half logarithms was observed. no decrease happened in the intestinal environment, even an increasing growth of strain was observed. The results of the antagonistic effect of Lactobacillus isolate with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by spot and well diffusion methods showed that the growth inhibitory effect against the studied pathogens was related to *Lactobacillus paracasei* with a growth inhibition zone diameter of 2.94±1.39 mm against *Staphylococcus aureus* and 2.59±1.37 mm against *Escherichia coli*. There was also no significant difference in the antagonistic effect of lactobacilli isolate against gram-positive and gram-negative bacteria. According to the results, *Lactobacillus paracasei* isolate showed a high percentage of auto aggregation characteristics and the average percentage during five hours of incubation at 37 ° C was 92.45%. Co-aggregation of Lactobacillus strain with pathogens (*Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*) was also investigated. The results are expressed as a percentage reduction after four hours in the adsorption of the mixed suspension compared to the individual suspension and according to the results, the tested strain showed a significant coaggregation with *Salmonella typhimurium*. Also, the results of hydrophobicity of *Lactobacillus paracasei* isolate show that this strain can have good hydrophobicity (57. 82%).

Conclusion: The strain isolated from traditional Semnan cheese showed desirable probiotic properties in vitro. Therefore, it is suggested that this isolate, as a new probiotic strain in the food industry, could be a good candidate for further in vitro complementary tests and in vivo research to demonstrate potential health benefits.

Key words: *Lactobacillus paracasei*, Probiotic Potential, Semnan Traditional Cheese