Food Research Journal

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

Evaluation of probiotic and antimicrobial properties of *Levilactobacillus brevis* NKN55 isolated from local yogurt

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

[1]Associate 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: April 26, 2024
Accepted: May 25, 2024
Published: July 4, 2024

Keywords:
Probiotic, *Levilactobacillus brevis*, Antioxidant, Antimicrobial, Anti adhesion.

ABSTRACT

Background: This laboratory study investigated the probiotic and antimicrobial properties of the *Levilactobacillus brevis* NKN55 strain isolated from local yogurt.

Aims: The aim of this study was to evaluate the functional potential and antimicrobial activity of the *Lev. brevis* NKN55 strain isolated from local yogurt. If the strain exhibits desirable functional and antimicrobial properties, it could be used as a supplementary culture or natural preservative in dairy products.

Methods: Initially, the strain was assessed for probiotic characteristics such as acid resistance (at pH levels 2.5, 3.5, and 4.5), hydrophobicity, bile resistance (at concentrations of 0.3%, 0.5%, and 0.7%), and cholesterol absorption. The production of biogenic amines, hemolytic activity, and DNase activity were also examined. The antioxidant capacity of the isolated strain was determined using DPPH and ABTS assays. The antimicrobial properties (disc diffusion agar and well diffusion agar methods) of the strain were tested against six foodborne pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella aerogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Bacillus cereus*). Additionally, the potential for adhesion to Caco-2 cells, anti-adhesion, auto-aggregation, and co-aggregation capabilities were evaluated.

Results: The highest reduction in the number of viable cells occurred after 3 hours at pH 2.5, with a reduction to 2.5. A significant decrease in viable cell count was observed when the pH was lowered from 4 to 2, decreasing from 7.8 to 6.90 Log CFU/mL. The *Lev. brevis* NKN55 strain demonstrated good resistance to different concentrations of bile salts, with growth ceasing at 0.7% bile salts. Hydrophobicity was measured at 58.40%. The strain showed negative results for biogenic amine production, DNase activity, and hemolytic activity. Cholesterol absorption was 39.10%, and the inhibition rates of DPPH and ABTS free radicals were 33.46% and 38.5%, respectively. Auto-aggregation and co-aggregation potentials were 33.8% and 21.45%, respectively. The adhesion potential to Caco-2 cells was 10.50%, and the anti-adhesion potential against *K. aerogenes* was 38.90% in competition, 31.20% in exclusion, and 19.8% in displacement assays.

Conclusion: The results showed that the *Lev. brevis* NKN55 strain possesses acceptable probiotic and antimicrobial potential and could be considered for human consumption after further research.

Food Research Journal, 2024,34(2): 101-120
DOI:10.22034/FR.2024.61357.1932

Extended Abstract

Introduction: Probiotics are living microorganisms that, when consumed in food, provide health benefits to the host. In the past, probiotics were used as substances consumed by microorganisms that stimulate the growth of other microorganisms. The composition of probiotics is defined as microbial supplements that create a positive effect by modifying the composition of the microbial flora (Jooyandeh et al., 2021). Among the effects of probiotics on human health, we can mention the improvement of milk digestibility in people with lactose intolerance, the enhancement of the immune system through antimicrobial peptide production, the synthesis of group B vitamins, the boost in the body's immunity, and the prevention of cell carcinogenesis (Fallah et al. 2019). Due to the conversion of fermentable sugars into organic acids, ethanol, and other metabolites with antimicrobial potential, these microorganisms create unfavorable conditions for the growth of potentially pathogenic microorganisms or agents of spoilage (Alizadeh Behbahani & Noshad., 2021). Native strains of lactic acid bacteria have found special importance in the dairy industry because these strains, in addition to being compatible with the conditions of the region, possess a unique ability to produce the desired taste and aroma in various types of fermented products. Additionally, these strains exhibit characteristics such as inherent resistance to destructive phages and antimicrobial effects (Rokhtabnak et al., 2015). The aim of this research was to investigate the functional potential and antimicrobial activity of the *Levilactobacillus brevis* NKN55 strain isolated from local yogurt. If it exhibits desirable functional and antimicrobial properties, it can be utilized in the production of dairy products either as a complementary culture or as a natural preservative.

Materials and Methods: Firstly, the strain was isolated and identified using molecular methods. Subsequently, the strain was evaluated for probiotic properties such as 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, hemolytic and DNase properties. The antioxidant property of the isolated strain (measured using DPPH and ABTS assays) was determined, and its antimicrobial activity against six foodborne pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*) was investigated using disc diffusion and agar well diffusion methods. Furthermore, adhesion potential to Caco-2 cells, anti-adhesion properties, auto-aggregation capacity, and co-aggregation of the strain were also evaluated.

Results and discussion: The maximum reduction in strain viability is associated with a shelf life of 3 hours at pH 2.5. As the pH decreased from 4 to 2, a significant decrease in the number of viable cells was observed, dropping from 7.8 to 6.90 Log CFU/mL. In this study, the growth of the strain decreased by 0.7% with an increase in bile salt percentage. The hydrophobicity of the strain was 58.4±0.40%. For the investigated strain, DNase, biogenic amine production, and hemolytic activity were negative. The cholesterol absorption rate was 10.39, while DPPH and ABTS free radical capacity were 33.46 and 38.5, respectively. The auto-aggregation potential was 33.8, and co-aggregation was 21.45. Adhesion potential to Caco-2 cell was 10.50, and anti-adhesion potential against *K. aerogenes* was 38.90 in competition, 31.20 in ability, and 19.8 in displacement. One of the important characteristics of lactic acid bacteria, crucial in their role in the food industry, is resistance to exposure to acidic conditions in products such as yogurt or buttermilk. For this purpose, the survival of these bacteria was tested at pH 2.5, 3.5, and 4.5. The results showed that the *Lev. brevis* NKN55 strain has a favorable shelf life under the investigated conditions.

To produce beneficial effects in the body, probiotics must be able to grow in the stomach and intestines and have the ability to live there. For this purpose, they must have the necessary resistance to

face hydrochloric acid in the stomach and bile salts in the intestine (Alizadeh Behbahani et al. 2020). The results showed that *Lev. brevis* NKN55 has good resistance to different concentrations of bile salts. In this study, the growth of the tested strain was inhibited by 0.7% with an increase in the percentage of bile salt. However, the growth rate depends on the concentration of bile salts. These results are similar to other studies that have shown lactobacilli can survive in high bile levels. Surface hydrophobicity can be used as a primary way to identify probiotic bacteria with adhesion properties and suitable characteristics for commercial purposes (Vasechi et al., 2020). The presence of hydrophobic molecules on the cell surface, such as surface proteins, cell wall proteins, cytoplasmic membrane proteins, and lipids, increases the cell's hydrophobicity. There is always concern about the commercial use of these bacteria because it is possible to transfer this gene to pathogenic bacteria and create resistance against them. The significant sensitivity of the isolated strain to multiple antibiotics indicates that this strain may not possess genes that cause antibiotic resistance. One critical aspect of probiotic bacteria that should be considered during evaluation is their antibacterial effect, attributed to metabolites such as organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl, ethanol, phenols, and protein compounds that inhibit growth (Barzegar et al., 2020). The most common antimicrobial compounds reported to be produced by probiotic bacteria include bacteriocins, hydrogen peroxide, and organic acids (especially lactic and acetic acids). Auto-aggregation is directly related to the adhesion potential of probiotic bacteria, while aggregation has a close interaction with pathogens (Patel et al., 2011). The auto-aggregation property helps bacteria adhere to intestinal cells and mucosal surfaces. Cell aggregation may enable bacteria to form a barrier that prevents colonization and biofilm formation by pathogenic bacteria. The ability of bacterial cells to attach to intestinal mucosa is called adhesion (Jena et al., 2013). In case of damage to the epithelial tissue, the probability of bacterial cell adhesion decreases. Probiotic bacteria are used to treat damage to the digestive system and replace its lost flora. By correcting the microbial balance inside the intestine, damaged tissue is improved, and the ability of microorganisms to bind to the surface of intestinal cells increases (Fontana et al., 2013).

Conclusion: The process of collecting and identifying native strains from fermentation products in any part of the country can cause Preservation of microbial and genetic reserves and provides useful information for scientific and commercial applications, especially in the field of dairy industries and the discussion of probiotics and functional foods. In this study, *Lev. brevis* NKN55 strain isolated from local yogurt was evaluated for its probiotic and antimicrobial potential. The results showed that this strain has a high ability to inhibit pathogenic bacteria. This bacterium tolerates different concentrations of bile salts well. It also has the ability to survive in acidic conditions. This bacterium tolerates different concentrations of bile salts well. It also has the ability to survive in acidic conditions. The studied strain was sensitive to common antibiotics and showed acceptable adhesion, hydrophobicity, auto-aggregation and accumulation. According to the results, it is suggested to use this strain as a probiotic supplement in fermentation cultures or as a co-culture in the production process of fermented food products after conducting more confirmatory tests.

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

بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدمیکروبی *Levilactobacillus brevis* NKN55 جداسازی شده از ماست محلی

بهروز علیزاده بهبهانی[1]✉* محمد حجتی[2]، بهاره گودرزی شمس آبادی[3]

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

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

مشخصات مقاله

نوع مقاله:
علمی پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۱۴۰۳/۲/۶
پذیرش: ۱۴۰۳/۳/۵
انتشار: ۱۴۰۳/۴/۱۴

چکیده

زمینه مطالعاتی: در این پژوهش آزمایشگاهی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدمیکروبی سویه *Levilactobacillus brevis* NKN55 جداسازی شده از ماست محلی بررسی شد.

هدف: این مطالعه به منظور بررسی پتانسیل عملکردی و فعالیت ضدمیکروبی سویه *Lev. brevis* NKN55 جداسازی شده از ماست محلی انجام شد، تا در صورت دارا بودن ویژگی‌های عملکردی و ضدمیکروبی مطلوب، در تولید محصولات لبنی به‌عنوان کشت مکمل و یا به‌عنوان نگهدارنده طبیعی مورد استفاده قرار گیرند.

روش کار: ابتدا سویه، از نظر ویژگی‌های پروبیوتیکی از قبیل مقاومت به اسید (pH ۲/۵، ۳/۵ و ٤/٥)، خاصیت هیدروفوبیسیتی، مقاوت به صفرا (۰/۳، ۰/۵و ۰/۷) و جذب کلسترول مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس تولید آمین بیوژنیک، عدم فعالیت همولیتیک و DNase نیز بررسی شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سویه جداسازی شده (DPPH و ABTS) تعیین گردید و ویژگی ضدمیکروبی (روش دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار) سویه، در مقابل ٦ باکتری بیماری‌زای غذازاد (*Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Klebsiella aerogenes*، *Listeria monocytogenes*، *Salmonella typhimurium* و *Bacillus cereus*) بررسی شد. پتاسیل چسبندگی به سلول Caco-۲، ضدچسبندگی، تجمیع خودکار و انباشتگی نیز تعیین گردید.

نتایج: بیشترین میزان کاهش تعداد سویه مربوط به ماندگاری ۳ ساعت در pH برابر با ۲/۵ بود. با کاهش pH از ٤/٥ به ۲/۵، کاهش قابل توجهی در تعداد سلول‌های زنده مشاهده شد و از ۷/۸ به ٦/۹۰ Log CFU/mL کاهش یافت. *Lev. brevis* NKN55 در غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی مقاومت خوبی از خود نشان داد. در این پژوهش رشد سویه مورد بررسی با افزایش درصد نمک صفراوی، در ۰/۷٪ متوقف شد. خاصیت هیدروفوبی، ٥٨/٤٠ درصد بود. تولید آمین بیوژنیک، DNase، و فعالیت همولیتیک منفی بود. میزان جذب کلسترول ۳۹/۱۰، میزان مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS به ترتیب ۳۳/٤٦ و ۳۸/۵۰ درصد، پتانسل تجمیع خودکار و انباشتگی به ترتیب ۳۳/۸ و ۲۱/٤٥ درصد به دست آمد. پتانسیل چسبندگی به سلول Caco-۲، ۱۰/۵۰ و پتانسیل ضدچسبندگی در برابر *K. aerogenes* در رقابت ۳۸/۹۰، در مهار ۳۱/۲۰ و در جابه‌جایی ۱۹/۸ درصد به دست آمد.

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

پژوهش‌های صنایع غذایی/ دوره ۳۴ شماره ۲، ۱۴۰۳، صفحات ۱۰۱ تا ۱۲۰
DOI:10.22034/FR.2024.61357.1932

مقدمه

پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف مقادیر مشخص از آن‌ها، اثر سلامت بخشی بر میزبان خواهند داشت. در گذشته از پروبیوتیک‌ها به عنوان مواد ترشح شده به وسیله‌ی یک میکروارگانیسم که محرک رشد میکروارگانیسم دیگر می‌باشد، استفاده می‌شد. امروزه پروبیوتیک‌ها مکمل‌های میکروبی تعریف می‌شوند که با اصلاح تعادل فلور میکروبی روده اثر مثبتی در میزبان ایجاد میکنند (جوینده و همکاران ۱٤۰۰، زیبایی راد و همکاران ۲۰۲٤). از آثار پروبیوتیک‌ها برسلامتی انسان می‌توان به بهبود در قابلیت هضم شیر در افراد مبتلا به عدم تحمل لاکتوز، تنظیم سیستم ایمنی تولید پپتیدهای ضدمیکروبی، تولید ویتامینهای گروهB، افزایش ایمنی بدن و جلوگیری از سرطانی شدن سلول‌ها اشاره نمود (فلاح و همکاران ۲۰۱۹). از میان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، باکتری‌های اسیدلاکتیک، یکی از مهمترین گروه‌های باکتریایی هستند که برای فرآوری انواع محصولات لبنی، گوشتی، سبزیجات و غلات استفاده می‌شوند (حجتی و همکاران ۱۳۹۹، فلاح و همکاران، ۲۰۲۱[a]). باکتری‌های اسیدلاکتیک گرم مثبت، فاقد اسپور و کاتالاز منفی هستند که محصول اصلی ناشی از تخمیر قند توسط آن‌ها اسیدلاکتیک می‌باشد. این باکتری‌ها اولین بار از شیر جداسازی شدند و به صورت گسترده به عنوان کشت آغازگر در صنایع لبنی، گوشت، سبزی‌ها و غلات به کار می‌روند (قاسمی و مژگانی ۱۳۹٤، کردونی و همکاران ۲۰۲۳). این باکتری‌ها جزئی از فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان هستند که نقش مهمی در تعادل میکروبی و تعدیل سیستم ایمنی دارند (علیزاده بهبهانی و همکاران ۱۳۹۹، علیزاده بهبهانی و همکاران ۲۰۲۳، علیزاده بهبهانی و همکاران ۲۰۲۰، فلاح و همکاران، ۲۰۲۱[b]، فلاح و همکاران، ۲۰۲۱[c]). امروزه بیش از ۲۰ جنس برای این خانواده وسیع و بزرگ در نظر گرفته شده است که مهمترین آن‌ها لوکونوستوک، لاکتوباسیلوس، استرپتوکوکوس، لاکتوکوکوس و پدیوکوکوس می‌باشند. این باکتری‌ها در فرآورده‌های تخمیری سنتی به وفور یافت می‌شوند و همچنین در فرآیندهای تخمیر کنترل شده مواد غذایی به عنوان کشت آغازگر یا کشت همراه مورد استفاده قرار می‌گیرند. این میکروارگانیسم‌ها به دلیل تبدیل قندهای قابل تخمیر به اسیدهای آلی، اتانول و سایر متابولیت‌هایی که پتانسیل ضدمیکروبی دارند، شرایط نامساعد برای رشد میکروارگانیسم‌هایی که به صورت بالقوه پاتوژن یا عامل فساد هستند، ایجاد می‌کنند (علیزاده بهبهانی و نوشاد ۱٤۰۰). سویه‌های بومی باکتری‌های اسیدلاکتیک اهمیت ویژه‌ای در صنایع لبنی یافته‌اند، چرا که این سویه‌ها علاوه بر آنکه دارای ویژگی‌های سازگاری با شرایط همان منطقه می‌باشد، از توانایی خاص در تولید طعم و بوی مطلوب در تهیه انواع فرآورده‌های تخمیری، برخوردار هستند. علاوه بر آن این سویه‌ها دارای ویژگی‌هایی از جمله مقاومت ذاتی به فاژهای مخرب وهمچنین اثر ضد میکروبی نیز می‌باشند (رختابناک و همکاران ۲۰۱۵). با توجه به اهمیت توصیف سویه‌های جدید پروبیوتیکی بومی، هدف از این پژوهش، بررسی پتانسیل پروبیوتیکی و ایمنی (مقاومت به اسید، مقاومت به نمک‌های صفراوی، جذب کلسترول، خاصیت ضدچسبندگی، هیدروفوبیسیتی، ظرفیت تجمع خودکار و انباشتگی سلول، پتانسیل چسبندگی به سلول Caco-2، تولید آمین بیوژنیک، فعالیت DNase و عدم فعالیت همولیتیک، ارزیابی فعایت آنتی‌اکسیدانی، جذب کلسترول و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی) سویه *Levilactobacillus brevis* NKN55 جداسازی شده از ماست محلی و همچنین ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی آن در برابر ٦ باکتری بیماری‌زای غذازاد (*Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *monocytogenes* ،*Klebsiella aerogenes* ،*Listeria* ،*Salmonella typhimurium* و *Bacillus cereus*) بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی سویه به روش ملکولی

این پژوهش آزمایشگاهی در سال ۱٤۰۲ در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. روش جداسازی

و شناسایی سویه مورد نظر مطابق با مطالعه سبکتکین و همکاران (۲۰۲۱) و وسیعی و همکاران (۲۰۱۸)، انجام شد. میزان ۵ گرم از نمونه به پپتون واتر (۰/۱ درصد؛ ٤٥ میلی‌لیتر) اضافه و نمونه‌ها هموژنیزه شدند و پس از آماده‌سازی رقت‌ها کشت روی محیط کشت MRS آگار انجام شد. این سویه از محیط کشت جدا شد و متعاقبا در معرض سنجش رنگ‌آمیزی گرم و کاتالاز قرار گرفت. بعد از آن، DNA ژنومی با استفاده از کیت Genomic DNA isolation VI استخراج شد و در محیط MRS براث به مدت یک شب کشت داده شد. پس از ایجاد رسوب در میکروتیوب‌های حاوی سوسپانسیون میکروبی و حل نمودن در ۲۰۰میکرولیتر بافر فسفات و افزودن محلول آنزیمی مناسب جهت رسیدن به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، طبق پروتکل شرکت سازنده، عمل گردید. از پرایمرهای عمومی[1] که بر اساس نواحی حفظ شده 16S rRNA طراحی شده‌اند، استفاده گردید. واکنش زنجیره ای پلیمراز[2] در کیت PCR در حجم نهایی ۲۵/۱۵ میکرولیتر انجام گرفت. میکروتیوب حاوی PCR داخل دستگاه ترموسایکلر[3] قرار گرفت و برنامه دمایی مطابق با مطالعه سبکتکین و همکاران (۲۰۲۰)، تنظیم شد. این برنامه دمایی شامل:

۱. فعالسازی: ۵ دقیقه در دمای ۲۵ سانتی‌گراد، یک سیکل.

۲. گسترش که خود شامل سه مرحله واسرشته سازی[4] (۳۰ ثانیه در۹٤ درجه سانتی‌گراد)، اتصال پرایمر (۳۰ثانیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد) و توسعه (۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد)، ۳۵ سیکل.

۳. گسترش نهایی: ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، یک سیکل.

الکتروفورز در ولتاژ ۹۵ ولت و زمان ٤٥ دقیقه انجام پذیرفت. سپس ژل در دستگاه ژل داک[5] رویت شد. نتایج نشان داد که ایزوله با خواص کاتالاز منفی و گرم مثبت با میزان شباهت ۹۸ درصد متعلق به سویه *Lev. brevis* NKN 55 است.

آزمون مقاومت به اسید

آزمون مقاومت به اسید مطابق با روش برزگر و همکاران (۲۰۲۱)، انجام شد. سویه به طور جداگانه به مدت۲٤-۱۸ ساعت در ۵ میلی لیتر MRS براث در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در شرایط بی‌هوازی کشت داده شد. باکتری‌های رشد یافته درg ٦۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. رسوب ایجاد شده دوبار توسط محلول نمک فسفات بافری[6] (سیگما – آلدریچ) شست‌وشو داده شده سپس نمونه کنترل به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه‌گذاری می‌شود. تعداد باکتری *Lev. brevis* رشد یافته شمارش شد. درجه زنده‌مانی سویه لاکتوباسیلوس از طریق مقایسه درصد کلنی‌های رشد کرده روی MRS آگار با غلظت کلنی‌های ابتدایی محاسبه گردید.

آزمون مقاومت به صفرا

ارزیابی مقاومت به صفرا بر اساس مطاله مومن زاده و همکاران (۱٤۰۰)، انجام شد. ابتدا سویه مورد نظر به مدت ۲٤ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سویه فعال شده، به‌مدت ۵ دقیقه با دور g۹۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده بر محیط‌هایMRS آگار حاوی ۰/۳، ۰/ ۵ و ۰/۷ درصد از نمک صفراوی کشت داده شد. پلیت‌ها به‌مدت ۲٤ 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 سطح سلول[7]

در این روش، ابتدا سویه مورد نظر در محیط MRS آگار رشد داده شد. پس از فعال‌سازی سویه در در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱٦ تا ۱۸ ساعت، سویه در ٦۰۰۰rpm به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس توسط محلول نمک فسفات بافری استریل و سرد شستشو و مجددا به صورت سوسپانسیون درآمده و جذب آن در ٦۰۰ نانومتر بر روی ۰/٦ تنظیم گردید(A_1). ٤ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر باکتری با ۲

[1] Universal-primer
[2] Polymerase chain reaction
[3] Thermocycler
[4] Denaturation
[5] Gel documentation system
[6] Phosphate buffered saline
[7] Cell surface hydrophobicity

میلی‌لیتر n –هگزادکان مخلوط و سپس به مدت دو دقیقه ورتکس شد. پس ازآن مخلوط ۱ ساعت در دمای محیط قرار گرفت تا انتقال باکتری بین دو فاز انجام شود و سپس جذب محلول آبی در ٦۰۰ نانومتر قرائت گردید(A_2). هیدروفوبیستی با رابطه زیر محاسبه شد(نوشاد و همکاران ۱٤۰۰):

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

تولید آمین بیوژنیک [1]

توانایی سویه‌های لاکتوباسیلوس برای تولید آمین بیوژنیک بر اساس مطالعه برزگر و همکاران (۲۰۲۱)، انجام شد. جهت انجام آزمون از محیط طراحی شده که حاوی آمینو اسیدهای پیش ساز از جمله ال–هیستیدین مونوهیدروکلراید، نمک تیروزین دی سدیم، ال–اورنیتین، مونوهیدروکلراید و ال–لیزین مونوهیدروکلراید بود، استفاده گردید. ابتدا سویه دو بار در محیط کشت MRS مایع حاوی ۰/۱٪ از هر اسید آمینه پیش ساز و ۰/۰۰۵ ٪ پیریدوکسال ۵–فسفات کشت شد. سپس سویه روی MRS آگارهای با و بدون اسیدهای آمینه که حاوی ۰/۰٦ بروموکرزول بنفش (سیگما) بودند کشت داده شد. پس از ۲ تا ۵ روز انکوباسیون، رنگ بنفش به دست آمده در کلنی‌های اطراف به عنوان تست مثبت در نظر گرفته شد.

۲-٦-تست دئوکسی ریبونوکلئاز و عدم فعالیت همولیتیک

جهت تعیین فعالیت DNase و فعایت همولیتیک، ابتدا سویه *Lev. brevis*NKN55 بر محیط کشت DNase آگار به صورت خطی کشت داده شد. بررسی تولید آنزیم پس از انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸ ساعت انجام شد. پلیت‌ها با ناحیه شفاف و صورتی در اطراف کلونی‌ها، DNase مثبت گزارش شد. بررسی عدم فعالیت همولیتیک سویه *Lev. brevis* NKN55 با کشت خطی بر محیط کشت تریپتیک سوی آگار (مرک آلمان) با ۷ درصد (v/v) خون گوسفند انجام شد. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها از نظر وجود هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها بررسی شدند. تشکیل هاله شفاف، هاله سبز رنگ یا عدم تشکیل هاله در اطراف کلنی‌ها به ترتیب نشان دهنده-β hemolysis، α-hemolysis و γ-hemolysis است. در این آزمون از باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* به عنوان نمونه کنترل برای-β hemolysis و α-hemolysis استفاده شد (وسیعی و همکاران ۲۰۲۰).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط مهار رادیکال DPPH[2] و ABTS[3]

جهت ارزیابی قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH، از روش شهرام پور و همکاران (۱۳۹۷)، استفاده گردید. ابتدا یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی سویه مورد نظر در آب مقطر استریل (معادل $CFU/mL10^9$)، به ۲ میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (۰/۰۵ میلی‌مولار) اضافه شد. میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از روماند فیلتر شده به ۳/۹ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۱ میلی‌مولار DPPH اضافه گردید و پس از مخلوط نمودن در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک نگهداری شد. جذب هر یک از محلول‌های مورد آزمون پس از سانتریفیوژ (g×۸۰۰۰ به مدت۱۰دقیقه)، در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی قابلیت مهار رادیکال آزاد ABTS، بر اساس مطالعه علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۳)، انجام شد. به طور خلاصه، ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه و ٦۰۰ میکرولیتر از محلول ABTS مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. میزان جذب در طول موج ۷۳٤ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت مهار رادیکال با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

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

جذب کلسترول

ابتدا محیط کشت MRS مایع به طور جداگانه استریل شد. پس از آن (0.3%) Oxgall ، همراه با پلی اکسی اتانیل–کلستریل سبکات به MRS مایع اضافه شد. کلسترول محلول با غلظت نهایی ۱ درصد به مایع MRS حاوی ۰/۳ درصد نمک

[1] Biogenic amine

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

[3] 2,2-azinobis ethylbenzothiazline-6-sulfonic acid

صفرا اضافه شد. کشت (۱٪) تلقیح شد (T) و سپس در ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت در شرایط بی‌هوازی انکوبه شد. شاهد مایع استریل بود که تلقیح نشده (C) بود. در نهایت میزان کلسترول باقی‌مانده در محیط از فرمول زیر بدست خواهد آمد (علیزاده و همکاران ۲۰۲۳):

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

آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها

به منظور بررسی حساسیت *Lev. brevis*NKN55 به آنتی‌بیوتیک، ابتدا از کشت جامد ۲٤ ساعت میکروارگانیسم، سوسپانسیونی معادل استاندارد نیم‌مک فارلند تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از آن روی محیط MRS آگار کشت سطحی داده شد. بعد از این مرحله دیسک‌های آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰µg/mL)، کلرامفنیکل (۳۰µg/mL)، پنیسیلین (۱۰µg/mL)، ونکومایسین (۳۰ µg/mL)، نیتروفورازون (۳۰۰µg/mL)، نالیدیکسیک (۳۰ µg/mL)، ایمیپنیم (۱۰ µg/mL)و سیپروفلوکساسین (۵ µg/mL)، روی محیط کشت قرار داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی، گرمخانه‌گذاری شدند. قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک پس ازگذشت ۲٤ ساعت، با خط‌کش اندازه‌گیری شده و نتایج بر حسب میلی‌متر گزارش شد (نوشاد و همکاران ۱٤۰۰).

ارزیابی فعالیت ضدباکتری سویه *Lev. brevis* NKN55

در این پژوهش از باکتری‌های پاتوژن *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Klebsiella aerogenes*، *Salmonella typhimurium*، *Listeria monocytogenes* و *Bacillus cereus* جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی به دو روش نفوذ در چاهک[1] و دیسک دیفیوژن[2] استفاده شد.

ابتدا سویه *Lev. brevis* NKN55 در ۱۰ میلی‌لیتر محیط MRS مایع تلقیح و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس کشت فعال آن تحت سانتریفوژ (g× ۵۰۰۰ به مدت ۱۵دقیقه) قرار گرفت و روماند حاصل برای اطمینان از حذف کامل سلول‌های باکتریایی از فیلتر سرنگی با قطر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. روماند بدست آمده تا زمان انجام آزمون در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (شهرام پور و همکاران ۱۳۹۷).

جهت ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی به روش نفوذ در چاهک (چاهک آگار) مطابق با مطالعه علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۳)، سویه در محیط کشت MRS براث، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند. سپس سانتریفیوژ در دور rpm ۵۰۰۰ به مدت۱۰ دقیقه و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت. ۵۰ میکرولیتر از کشت فعال، با رقتی معادل نیم‌مک فارلند (۱/۵×۱۰^{۸} CFU/mL)، در سطح پلیت حاوی محیط کشت MHA تلقیح شد. سپس چاهک‌هایی با قطر ٦ mm و با استفاده از انتهای پیپت استریل در پلیت‌ها ایجاد شد و عصاره باکتری (۱۱۰µl)، به چاهک‌ها تزریق گردید. جهت جذب و انتشار بهتر ترکیبات ضدمیکروبی از چاهک‌ها، پلیت‌ها به مدت یک ساعت در یخچال (٤ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف چاهک‌ها به کمک خط‌کش اندازه‌گیری پس از طی ۲٤ ساعت و بر حسب میلی‌متر گزارش گردید.

در روش انتشار در دیسک (دیسک دیفیوژن آگار)، ابتدا سویه در محیط کشت MRS مایع و باکتری‌های شاخص بیماری‌زا در محیط کشت MHB در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت کشت داده شدند. شاخص‌های باکتریایی با روش جذب‌خوانی به معادل استاندارد نیم‌مک فارلند تنظیم گردید. در مرحله بعد، دیسک‌های کاغذی استریل (پادتن طب، ایران) با فاصله معین از لبه پلیت در سطح محیط کشت حاوی باکتری‌های شاخص قرار داده شده و سپس ٤۰ میکرولیتر از سویه بر دیسک‌های کاغذی ریخته شد. نهایتاً پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و قطر هاله عدم رشد نیز با خط کش اندازه‌گیری گردید (علیزاده بهبهانی و همکاران ۲۰۲۳).

[1]Agar well diffusion method

[2]Disk diffusion test

ظرفیت تجمع خودکار و انباشتگی سلول

ارزیابی این ویژگی‌ها برای کلونیزاسیون باکتری‌های پروبیوتیک و همچنین پیشگیری از چسبندگی پاتوژن باکتریایی و تشکیل بیوفیلم ضروری است. برای ارزیابی این ویژگی از روش وسیعی و همکاران (۲۰۲۰)، استفاده شد. ابتدا کشت شبانه‌ای از سویه مورد نظر سانتریفیوژ شده (۶۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه) سپس از با استفاده از بافر سرد فسفات پلت‌ها تا رسیدن به جذب ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومترشستشو داده شد (A_0). نمونه به دست آمده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد و دانسیته نوری سوسپانسیون میکروبی اندازه‌گیری شد (A_1). ظرفیت تجمع خودکار با استفاده از فرمول زیر به‌دست آمد:

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

مقادیر مساوی از *Lev. brevis* NKN55 و *K. aerogenes* مخلوط و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس این مخلوط به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. مقدار جذب مخلوط در طول موج ۶۰۰ نانومتر برای و همچنین مقدار جذب این مخلوط و هر سوسپانسیون به صورت جداگانه اندازه‌گیری شد. میزان انباشتگی نیز با معادله زیر محاسبه شد.

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

که در این فرمول A_m میزان جذب سوسپانسیون مخلوط را بعد از ۳ ساعت نشان می دهد و A_p و A_s نشان دهنده جذب *Lev. brevis* NKN55 و *K. aerogenes* می‌باشد.

پتانسیل چسبندگی به سلول Caco-2

سویه از نظر ظرفیت چسبندگی با استفاده از سلول‌های مطابق با مطالعه فلاح و همکاران (۱۳۹۸)، مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌های Caco-2 در محیط کشت DMEM[1] (حاوی ۱٪ پنی سیلین استرپتومایسین و ۱۰٪ FBS[2] غیرفعال شده با حرارت) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط محیطی ۵ به ۹۵ در صد از CO_2 و رطوبت ثابت، نگهداری شدند. برای انجام آزمون چسبندگی، سلول‌های Caco-۲ در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شدند، به طوری که دانسیته سلول به ۳۰۰۰۰ $Cells/cm^2$ رسید. رشد سلول‌ها به مدت ۱۵ روز ادامه پیدا کرد و محیط کشت هر ۲ روز یکبار تعویض شد. در نهایت یک لایه نازک و پوشیده شده از سلول کف پلیت تشکیل شد. سویه فعال شده را سانتریفوژ کرده (۶۰۰۰rpm، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) و با استفاده ازمحیط کشت DMEM شست و شو داده و با بافر فسفات استریل به OD=۱ رساندیم. تعداد باکتری نیز در محیط کشت MRS آگار شمارش شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون را به سلول Caco-۲ که از قبل با بافر فسفات شست و شو شده و از حذف آنتی‌بیوتیک مطمئن شدیم، اضافه نموده، به طوری که نسبت ۲ -Caco به باکتری بیش از ۱ به ۱۰۰ شد. پس از ۱ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصدCO_2 ، به منظور حذف سلول‌های اتصال نیافته، ۳ مرتبه شست و شو با بافر فسفات انجام شد. برای جداسازی باکتری‌ها از سلول، ۱ میلی‌لیتر تریتون X100 به چاهک اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. توانایی چسبندگی باکتری براساس تعداد باکتری‌های چسبیده نسبت به تعداد کل باکتری اولیه گزارش شد.

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

خاصیت ضد چسبندگی سلول

ارزیابی رقابت، بازداری و جایگزینی به منظور بررسی پتانسیل ضد چسبندگی باکتری *K. aerogenes* مطابق با مطالعه کردونی و همکاران (۲۰۲۳)، انجام شد. مقادیر مساوی از باکتری‌ها به چاهک‌ها اضافه شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت در شرایط محیطی ۵ به ۹۵ در صد از CO_2 و رطوبت ثابت، گرمخانه‌گذاری شدند. از بافر فسفات استریل برای شستشوی باکتری‌های آزاد و۰/۰۵٪ از تریتون۱۰۰ X- برای جدا کردن باکتری‌های چسبیده استفاده شد (گونه‌های پروبیوتیک و بیماری زا). برای تشخیص پاتوژن‌ها، محیط‌های

[1] Dulbecco's modified Eagle's medium

[2] Fetal bovine serum

انتخابی استفاده شد و رقابت بین دو گونه برای چسبندگی سلول‌های Caco-۲ با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{Competition}=\left(\frac{\text{Adhered } K.\ aerogenes \text{ with } Lev.\ brevis \text{ KNK55}}{\text{Bounded } K.\ aerogenes \text{ with } Lev.\ brevis \text{ KNK55}}\right)\times 100$$

برای ارزیابی توانایی پروبیوتیک‌ها در مهار چسبندگی *K. aerogenes* به سلول‌های روده ای از روش مهاری استفاده شد. ابتدا *Lev. brevis* NKN55 به یک چاهک حاوی سلول‌های Caco-۲ منتقل شد و در در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت تحت فشار CO_2 گرمخانه‌گذاری شد. برای حذف باکتری‌های آزاد و *K. aerogenes* از شستشو با بافر استات استفاده شد و سپس به چاهک اضافه شدند. سپس به مدت ۱ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و حذف *K. aerogenes* با جدا کردن سلول‌های Caco-۲ و گونه‌های باکتری با تریتون X-۱۰۰ انجام شد. شمارش باکتری‌ها انجام شد و اثر مهاری به صورت زیر محاسبه شد.

$$\text{Inhibition}=\left(1-\frac{K.aerogenes \text{ Adhesion in the presence of } Lev.\ brevis}{k.\ aerogenes \text{ Adhesion in the abcence of } Lev.\ brevis}\right)\times 100$$

سنجش جایگزینی به منظور ارزیابی جایگزینی *Lev. brevis* NKN55 با سویه بیماری‌زا سلول‌های روده ای انجام می‌شود. مراحل آزمایش مجددا تکرار می‌شود با این تفاوت که ابتدا باکتری *K. aerogenes* و سپس *Lev. brevis* NKN55 پس از انکوباسیون (۱ساعت) اضافه شد. درصد جابجایی با مقایسه *K. aerogenes* چسبیده با آن‌هایی که *Lev. brevis* NKN55 نداشتند، محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

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

نتایج و بحث

مقاومت به اسید

یکی از ویژگی‌های مهم باکتری‌های اسیدلاکتیکی که در نقش آن‌ها در صنایع غذایی مهم است، مقاومت نسبت به قرارگیری در شرایط اسیدی محصولاتی مانند ماست یا دوغ است (علیزاده بهبهانی و همکاران ۱۳۹۹). به این منظور زنده‌مانی این دو باکتری طی pHهای ۲/۵، ۳/۵ و ٤/٥ مورد آزمون قرار گرفت. نتایج نشان داد سویه *Lev. brevis* NKN55 ماندگاری مطلوبی در شرایط مورد بررسی دارد. با این حال بیشترین میزان کاهش سویه مربوط به ماندگاری ۳ ساعت در pH ۲/۵ می‌باشد. با کاهشpH از٤/٥ به ۲، کاهش قابل توجهی در تعداد سلول‌های زنده مشاهده شد و از ۷/۸ به ٦/۹۰ Log CFU/mL کاهش یافت. یکی از معیارهای اصلی انتخاب باکتری‌های پروبیوتیک، زنده‌مانی در pH پایین دستگاه گوارش است. در مطالعه مشابه‌ای، سینگ، گانگر و پاتیل (۲۰۲۰)، گزارش کردند که *Lev. brevis* ATCC14869 جدا شده از کلم ترش، قادر به رشد و زنده ماندن در pH پایین است. اسید معده از اهمیت بسیار زیادی در جلوگیری از کلونیزاسیون میکروبی نامطلوب برخوردار است و نقش مهمی در کاهش میزان بقای میکروارگانیسم‌های بیماریزا دارد. لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی که به میزان زیادی در معرض اسید معده قرار می‌گیرند. از پاسخ‌ها و مکانیسم‌های مختلف سلولی برای تحمل شرایط نامناسب اسیدی معده، مانند پمپ‌های پروتون، ترمیم پروتئین‌ها برای آسیب DNA، تغییر در پوشش سلولی و متابولیسم تغییر یافته بهره می‌گیرند (مونتورو و همکاران ۲۰۱۸). نوری و همکاران (۱۳۹۷)، گزارش کردند که هیچ یک از سویه‌های لاکتیک اسید باکتری‌ها در pH برابر با ۲ رشدی نداشتند. در پژوهش توکلی و همکاران (۱۳۹۷)، از بین ۳۰۰ سویه لاکتوباسیلوس جدا شده از پنیر محلی مازندران، ۱٦ سویه توانایی بقا در شرایط ۲/۵ pHرا دارا بودند.

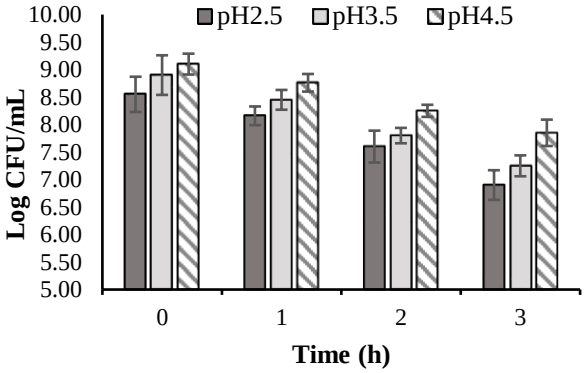

Fig. 1. The capacity of *Levilactobacillus brevis* NKN55 to endure in an acidic pH environment.

Table 1. The effect of different concentrations of bile salt on the viability of the *Levilactobacillus brevis* NKN55

	0.3%	0.5%	0.7%	Control
Survivability	Growth	Growth	Not grown	Growth

مقاومت به صفرا

پروبیوتیک‌ها برای ایجاد اثرات سودمند در بدن باید قادر به رشد در معده و روده بوده و توانایی سکونت در آن‌جا را داشته باشند به همین منظور باید مقاومت لازم جهت مواجه شدن با اسیدکلریدریک معده و نمک‌های صفراوی موجود در روده در آن‌ها وجود داشته باشد (رامشگر و همکاران ۱٤۰۰). هنگامی که باکتری‌ها به روده کوچک برسند، در معرض شرایط ضدمیکروبی متعددی مانند آنزیم‌های پروتئولیتیک، پپتیدهای ضدمیکروبی و نمک‌های صفراوی قرار می‌گیرند. غلظت ۰/۳ درصد از نمک‌های صفراوی یک غلظت بحرانی است که به طور کلی برای انتخاب سویه‌های مقاوم مورد استفاده قرار می‌گیرد (عیسوند و همکاران ۱٤۰۰). نمک‌های صفراوی در هضم ترکیبات چربی دوست موثر هستند ولی گاها نوعی خاصیت آنتی‌بیوتیکی از خود نشان داده و مانع از رشد میکروبیوتای دستگاه گوارش می‌شوند. در این پژوهش ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ (W/V)، نمک‌های صفراوی برای بررسی مقاومت سویه مورد نظر مورد آزمون قرار گرفت. نتایج بررسی مقاومت به نمک صفراوی در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که *Lev. brevis* NKN55 در غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی مقاومت خوبی دارد. در این پژوهش رشد سویه مورد آزمایش با افزایش درصد نمک صفراوی، در ۰/۷٪ متوقف شد. با این حال، نرخ رشد به غلظت نمک‌های صفراوی بستگی دارد.

این نتایج مشابه سایر مطالعاتی است که نشان داده‌اند که لاکتوباسیلوس‌ها می تواند در درجات صفراوی بالا خود را حفظ کند (برزگر و همکاران ۲۰۲۱، ابوشلاییبی و همکاران، ۲۰۱۷؛ بوریچا و همکاران، ۲۰۱۹؛ مولاو و همکاران، ۲۰۱۹؛ اولاتوند و همکاران، ۲۰۱۸؛ شهاتا و همکاران، ۲۰۱٦). بقای پتانسیل مقاومت سویه‌های پروبیوتیک به نمک‌های صفراوی ممکن است با فعالیت آن‌ها در جداسازی نمک های صفراوی به کلسترول و اسیدهای آمینه مرتبط باشد.

هیدروفوبیستی سطح سلول

آبگریزی سطحی می‌تواند به عنوان راه‌های ابتدایی شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک با خصوصیات چسبندگی و با ویژگی‌های مناسب برای اهداف تجاری استفاده شوند (واسچی و همکاران ۱۳۹۹). آبگریزی جز خواصی است که مستقیماً به توانایی چسبندگی سویه نسبت داده می‌شود. برای تشخیص هیدروفوبیستی می‌توان از ترکیبات مختلفی از جمله ان-هگزادکان، زایلن، اتیل استات و کلروفرم استفاده کرد (برزگر و همکاران ۲۰۲۰). کاهش جذب سوسپانسیون بعد از قرار گرفتن سلول در معرض هیدروکربن نشان دهنده خاصیت هیدروفوبی باکتری می‌باشد که در مورد *Lev. brevis* NKN55 میزان ۰/٤۰±۵۸/٤ درصد می‌باشد. در مطالعه ای مشابه، *Lev. brevis* جدا شده از سرکه زالزالک، آبگریزی سطحی ٤٦٪/۲۹ برای n-هگزادکان نشان داد (کوکبای و همکاران ۲۰۲۳). علاوه بر این، تحقیقات انجام شده توسط فادری و همکاران (۲۰۲۳)، نشان داد که *Lev. brevis* مشتق شده از کلم ترش، ۵۱ درصد بود. آبگریزی سطح سلول باکتری یکی از مهمترین عوامل تعیین کننده در چسبیدن باکتری به سطح زنده و غیرزنده است. وجود مولکول‌های آبگریز در سطح سلول، مانند پروتئین‌های سطحی، پروتئین‌های دیواره سلولی،

پروتئین غشای سیتوپلاسمی و لیپیدها، آب گریزی سلول را افزایش می‌دهد (وسیعی و همکاران ۲۰۱۷).

تولید آمین بیوژنیک

تولید آمین بیوژنیک توسط *Lev. brevis* NKN55 مشاهده نشد. آمین بیوژنیک (BA)، عمدتاً از آمیناسیون و ترانس آمیناسیون آلدئیدها و کتون‌ها یا دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه تشکیل می‌شود و معمولاً در غذاهایی یافت می‌شود که فاقد پروتئین و اسیدهای آمینه هستند و تحت تأثیر فرآیندهای میکروبی یا بیوشیمیایی مانند تخمیر قرار می‌گیرند (برزگر و همکاران ۲۰۲۰). مصرف غذاهای حاوی مقادیر زیاد از آمین‌های بیوزنیک ممکن است منجر به اثر سمی مانند سردرد، مشکلات کلیوی، مسمومیت، حالت تهوع، افت فشار خون و فشار خون بالا و در موارد شدید خونریزی داخلی مغز و یا مرگ شود (میلریو و همکاران ۲۰۱۹). سمیت بستگی به اثر سم‌زدایی دارد که در افراد متفاوت است. الکل، استالدئید و داروهای ضد افسردگی می‌توانند با فعالیت آنزیم‌های آمینواکسیداز تداخل داشته باشند (برینک و همکاران ۱۹۹۷). در پژوهشی مشابه، علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۳)، گزارش کردند *Lev. brevis* HL6 تولید آمین بیوژنیک را نشان نداد. تشکیل آمین‌های بیوژنیک در طی فرآیند موادغذایی به در دسترس بودن اسیدهای آمینه آزاد، حضور میکروارگانیسم‌هایی با مسیر کاتابولیک مناسب و محیط مساعد برای فعالیت دکربوکسیلاز بستگی دارد. آمین‌های بیوژنیک به عنوان پیش‌سازهایی برای سنتز هورمون‌ها، آلکانوئیدها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها مطرح بوده و در متابولیسم‌های بدن مانند فشارخون و تنظیم دما نقش دارند. کنترل تجمع آمین‌ها در فراورده‌های تخمیری که بخش اعظم آمین‌های بیوژن در موادغذایی را هیستامین تشکیل می‌دهد یکی از چالش‌های حاضر در صنعت غذا می باشد. متابولیسم هیستامین می‌تواند توسط تیرامین، پوترسین و کاداورین با رقابت با مکان‌های محدود کننده در دستگاه گوارش یا با اشباع فعالیت مونو یا دی آمین اکسیدازها مهار شود (کلی و همکاران ۲۰۱۰).

تست دئوکسی ریبونوکلئاز و عدم فعالیت همولیتیک

بر اساس نتایج به دست آمده، تولید DNase توسط *Lev. brevis*NKN55 منفی بود و و هیچ ناحیه واضحی در اطراف کلنی‌ها روی محیط کشت مشاهده نشد. این امر می‌تواند نشان دهنده پتانسیل آن در تهیه پروبیوتیک باشد. همچنین پاسخ به‌دست آمده از فعالیت همولیتیکی نیز منفی بود. اهمیت این آزمایش در بررسی عدم تجزیه کنندگی خون و در نتیجه عدم بیماری‌زایی توسط سویه جداسازی شده می‌باشد. علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۳)، پتانسیل پروبیوتیکی، ایمنی و ضد بیماری‌زایی ، *Lev. brevis* HL6 و کاربرد بالقوه آن به عنوان نگهدارنده‌های زیستی در آب هلو مورد ارزیابی قرار گرفت و بیان شد سویه مورد بررسی تولید DNase یا تولید آمین بیوژنیک را نشان نداد. سویه *Lev. brevis*AcCh91 جداسازی شده از چورپی (محصول شیر تخمیر شده خانگی هندی)، در پژوهش شانگپلیانگ و تامانگ (۲۰۲۳)، نیز نتایج مشابه‌ای را نشان داد و هیچ نشانه‌ای از همولیز نشان نداد. علیرغم این واقعیت که باکتری‌های اسیدلاکتیک سابقه طولانی در استفاده ایمن دارد، ارزیابی ایمنی برای اعلام پتانسیل پروبیوتیک ایزوله‌های جدید الزامی است (پینو و همکاران ۲۰۱۹). فعالیت همولیتیک نسبت به گلبول‌های قرمز پستانداران و تولید DNase به عنوان استانداردهای طلایی ارزیابی ایمنی استفاده می‌شود. سویه انتخاب شده معیارهای اساسی پروبیوتیک را برآورده کرد زیرا تولید همولیزین یا DNase را نشان نداد که نشان می دهد می‌توان آن را برای استفاده در داخل بدن بی خطر فرض کرد. در مطالعه‌ای مشابه مشتاق و همکاران (۲۰۲۰)، نیز گزارش دادند که سویه‌های *Lev. brevis* MZ384011 و *Lev. brevis* MW362779 فعالیت همولیتیک و DNase از خود نشان ندادند.

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی توسط مهار رادیکال DPPHو ABTS

میزان درصد مهار رادیکال‌های آزاد توسط *Lev. brevis* NKN55 در شکل ۲، نشان داده شده است. استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل بین عملکردهای اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی است. انسان‌ها دارای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در بدن هستند و زمانی که گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) انباشته شده از

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ذاتی خود فراتر رود، اکسیداسیون بیش از حد باعث آسیب به سلول‌ها یا بافت می شود. بنابراین، آنتی اکسیدان‌های خارجی برای کاهش استرس اکسیداتیو با بهبود توانایی آنتی‌اکسیدانی فردی مورد نیاز هستند. سنجش‌های آنتی‌اکسیدانی مختلفی، شامل رادیکال‌های غیر بیولوژیکی پایدار، برای تعیین فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد پروبیوتیک‌ها انجام شده است (لی و ین ۱۹۹۹). باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتری‌های بی خطری هستند که توانایی تولید چندین ترکیب مانند اسید آلی و باکتریوسین را دارند و دارای مزیت کم بودن عوارض جانبی هستند (حامد ۲۰۲۱). هنگامی که باکتری‌های اسیدلاکتیک به مجرای روده متصل می شود، باکتری اسیدلاکتیک و متابولیت‌های آن برای حذف ROS افزایش می‌یابد و در نتیجه تعادل اکسیداسیون-کاهش روده حفظ می‌شود. علاوه بر این، مشخص شده است که باکتری‌های اسیدلاکتیک با در نظر گرفتن ارزش غذایی، ایمنی و عملکرد پروبیوتیک، یک آنتی‌اکسیدان خارجی قوی طبیعی است (تانگ و همکاران ۲۰۱۸). همچنین *Lev. brevis* LAP2 و *Lev. brevis* AN1 و *L. fermentum* SNR1 سویه‌های پروبیوتیک آنتی‌اکسیدانی قوی بوده اند. بنابراین می‌تواند به عنوان یک سویه ایمن برای مصارف ارتقاء سلامت در نظر گرفته شوند (کردونی و همکاران ۲۰۲۳، آرتی و همکاران ۲۰۱۷ و آیانا و همکاران ۲۰۱۸).

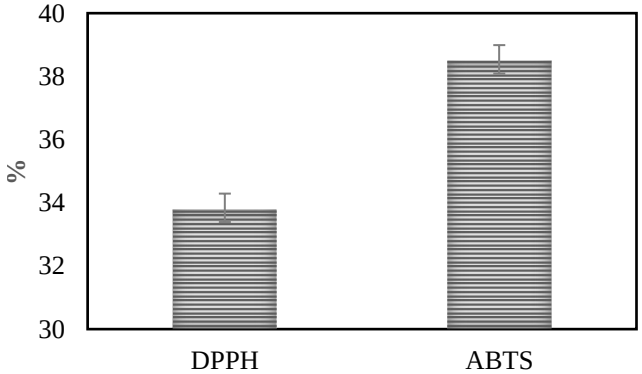

Fig. 2. The antioxidant activity (DPPH & ABTS) of *Levilactobacillus brevis* KNK55.

جذب کلسترول

میزان توانایی *Le. brevis* NKN55 در کاهش میزان کلسترول در این مطالعه ۰/٤۷ ± ۳۹/۱ درصد بود. نتیجه به دست آمده با نتایج مشابه موجود، مبنی بر توانایی سویه‌های *Lev. brevis* در کاهش کلسترول مطابقت دارد (فوسی و همکاران۲۰۲۲). حجتی و همکاران (۲۰۲۰)، نیز در پژوهش خود، میزان تجزیه کلسترول را برای *Lev. brevis* gp104 در محیط فاقد نمک‌های صفراوی، ٤۱ درصد و در محیط حاوی نمک‌های صفراوی، ۵۸ درصد گزارش کردند. منیر و همکاران (۲۰۲۲)، در مطالعه خود بیان کردند *Lev. brevis* ML950194 و *Lev. brevis* ML365351 ، میزان کلسترول بالا (۳۵ و ٥٤ درصد) را از محیط‌های حاوی نمک‌های صفراوی (۰/۳درصد) در مقایسه با *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 کاهش دهند و کمترین بیماری‌زایی را نسبت به آن نشان دادند. در این مطالعه تولید اگزوپلی ساکارید، چسبندگی سطح سلولی کلسترول و فعالیت Bile Salt Hydrolase (BSH) به عنوان مکانیسم‌های کاهش دهنده کلسترول مشاهده شد. از آن‌جایی که باکتری‌های پروبیوتیک می‌توانند کلسترول را جذب کنند، مصرف طولانی مدت موادغذایی حاوی این گونه باکتری‌ها تا حد زیادی در سلامتی مفید و تاثیرگذار است (وسیعی و همکاران ۲۰۲۲).

آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها

میزان مقامت سویه نسبت به هشت آنتی‌بیوتیک رایج درمانی مورد بررسی قرار گرفت. میزان مقاومت سویه *Lev. brevis* NKN55 نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در جدول ۳، آورده شده است. حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های اسیدلاکتیک، که یک ویژگی پروبیوتیک است و سطح مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند در بین سویه‌های مختلف و حتی در زیر گونه‌ها متفاوت باشد (زیبایی راد و همکاران ۲۰۲۳). همواره نگرانی در مورد استفاده تجاری از این باکتری‌ها وجود دارد و آن امکان انتقال این ژن به باکتری‌های بیماری‌زا و ایجاد مقاومت در برابر آن‌ها است (وسیعی و همکاران، ۲۰۲۰). در مطالعه علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۳)، *Lev. brevis* HL6 تقریباً به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بود و بیشترین و

کمترین حساسیت به ترتیب برای نیتروفورانتوئین (IZ = 26 میلی‌متر) و آمپی سیلین (IZ = 10.50 میلی متر) یافت شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی ممکن است به‌طور طبیعی اتفاق بیفتد یا توسط مکانیسم‌های ژنتیکی مانند انتقال ژن از طریق پلاسمیدها یا ترانسپوزون‌ها حاصل شود (علیزاده بهبهانی و همکاران ۲۰۱۹). براساس مطالعه مشتاق و همکاران (۲۰۲۳)، *Lev. brevis* MT95019، در برابر تمام آنتی بیوتیک‌ها به جز پنی‌سیلین G مقاومت نشان داد. حساسیت قابل توجه سویه جدا شده به آنتی‌بیوتیک‌های متعدد نشان می‌دهد که ممکن است این سویه ژن‌هایی را که باعث ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شود، نداشته باشد.

Table 3. Effect of common antibiotics on the growth of *Levilactobacillus brevis* NKN55

Antibiotic	*Lev. brevis*NKN55
Vancomycin	Sensitive
Gentamicin	Sensitive
Chloramphenicol	Sensitive
Nitrofurazone	Intermediate
Nalidixic	Sensitive
Penicillin	Intermediate
Imipenem	Intermediate
Ciprofloxacin	Sensitive

ارزیابی فعالیت ضدباکتری سویه *Lev. brevis*NKN55

فعالیت ضدباکتری، یکی جنبه‌های حیاتی باکتری‌های پروبیوتیک است که باید در هنگام ارزیابی در نظر گرفته شود. اثر ضدباکتریایی پروبیوتیک‌ها را می‌توان به متابولیت‌هایی مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دی استیل، اتانول، فنل‌ها پروتئین ترکیباتی که باعث رشد می‌شوند نسبت داد. رایج‌ترین ترکیبات ضدمیکروبی گزارش شده که توسط باکتری‌های پروبیوتیک تولید می‌شود شامل باکتریوسین‌ها، پراکسید هیدروژن و اسیدهای آلی (به خصوص لاکتیک و استیک اسیدها) می‌باشد (برزگر و همکاران ۲۰۲۰). اثر ضدمیکروبی *Lev.brevis* NKN55 اسیدی و غیراسیدی بر سویه‌های پاتوژن به روش انتشار در آگار به کمک دیسک و چاهک در شکل‌های ۳ و ٤ نشان داده شده است. در هر دو روش بیشترین اثر بازدارندگی روی *L. monocytogenes* بود. این باکتری بی‌هوازی اختیاری است و قادر به زنده ماندن در بود و نبود اکسیژن است و به عنوان عامل ایجاد کننده طیف وسیعی از حضور اسیدهای چرب هیدروکسی، اسیدهای آلی و هیدروژن پراکسید می‌باشد. بنابراین در مورد لاکتوباسیلوس‌ها دلیل عمده وجود خاصیت ضدمیکروبی تولید باکتریوسین می‌باشد ولی وجود ترکیباتی مثل هیدروژن پراکسید و اسیدهای آلی، اتانول و رقابت بر سرمواد مغذی نیز بی‌تاثیر نیست (جرجیوا و همکاران ۲۰۱۵). نتایج فعالیت ضدمیکروبی پژوهش حاضر با مطالعه حجتی و همکاران (۲۰۲۳)، مطابقت داشت.

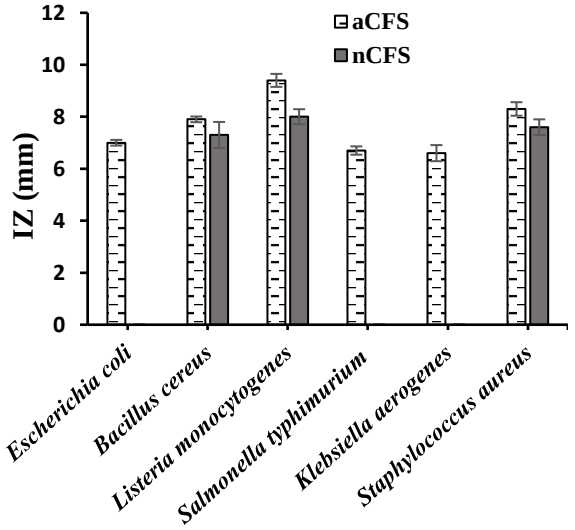

Fig. 3. The antimicrobial effect of *Levilactobacillus brevis* NKN55 using disk diffusion agar.
The abbreviations aCFS and nCFS stand for acid cell-free supernatants and neutralized cell-free supernatants, respectively.

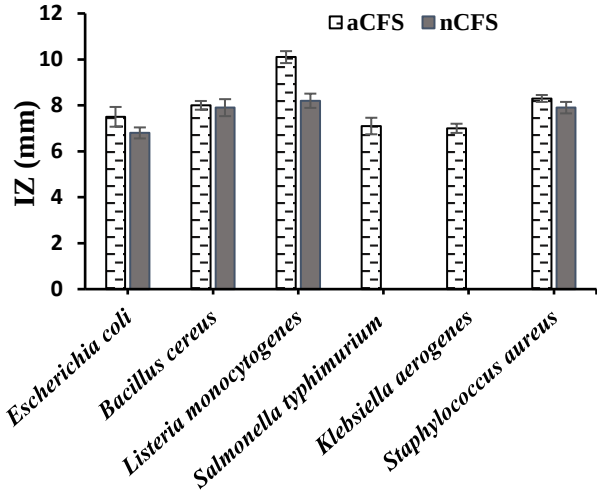

Fig. 4. The antimicrobial effect of *Levilactobacillus brevis* NKN55 using well diffusion agar
The abbreviations aCFS and nCFS stand for acid cell-free supernatants and neutralized cell-free supernatants, respectively.

علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۳)، در مطالعه خود گزارش کردند که سویه *Lev. brevis* HL6، بیشترین فعالیت ضدمیکروبی خود را مقابل *S. aureus* و کمترین میزان فعالیت را در برابر پاتوژن *E. coli* نشان داد. *Lev. brevis* خاصیت ضدمیکروبی بر باکترهای بیماری‌زا از جمله *S. aureus* ATCC 29213، *K. pneumonia* ATCC 700603 و *E. coli* ATCC 25922 داشت (وگیوکلاکی و همکاران ۲۰۲۲).

ظرفیت تجمع خودکار و انباشتگی سلول

تجمع خودکار، ارتباط مستقیم با پتانسیل چسبندگی باکتری‌های پروبیوتیک دارد در حالی که انباشتگی تعامل نزدیک با پاتوژن‌ها دارد. میزان ظرفیت تجمع خودکار برای سویه *Lev. brevis* NKN55 ، ۰/٤۰+ ۳۳/۸ و میزان انباشتگی سلول ۰/۵۵+ ۲۱/٤۵ به دست آمد. سویه‌ها در صورتی که آبگریزی قوی و ظرفیت تجمع خودکارداشته باشند به تک لایه‌های سلولی روده انسان متصل می‌شوند (پتل و همکاران، ۲۰۱۱). مطالعه برزگر و همکاران (۲۰۲۰)، نشان داد *Lactiplantibacillus plantarum* B20 و *Lev. brevis* B2 درجات بالایی از تجمع خودکار را نشان دادند. خاصیت تجمع خودکار به باکتری‌ها کمک می‌کند تا به سلول‌های روده و سطوح مخاطی بچسبند. انباشتگی سلول ممکن است باکتری‌ها را قادر به تشکیل سدی کند که از کلونیزاسیون و تشکیل بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کند. جنا و همکاران (۲۰۱۳)، تجمیع خودکار سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از میکروبیوتای مدفوع موش صحرایی را ۳۳/۲٪ و ٤۷/۲٪ گزارش کردند، در حالی که هم انباشتگی با سویه‌های بیماری‌زا بین ۸۹٪/۱۱ و ۳۸/۲۲٪ و بالاترین دامنه میزان هم انباشتگی با *S. aureus* مشاهده شد. در مطالعه حجتی و همکاران (۲۰۲۰)، پتانسیل تجمیع خودکار سویه *Lev. brevis* gh104، ٤۰/۲ ٪ و پتانسیل انباشتگی سویه ٤۸/۳ ٪ گزارش شد. توو و همکاران (۲۰۱۳)، در مطالعه‌ای ویژگی‌های تجمع و چسبندگی برخی از سویه‌های لاکتوباسیلوس را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که پروتئین‌های متصل به سطح و سایر ماکرومولکول‌ها نقش مهمی در قابلیت‌های خود تجمعی و چسبندگی دارند.

پتانسیل چسبندگی به سلول Caco-۲

توانایی اتصال سلول باکتری به موکوز روده تحت عنوان چسبندگی نامیده می‌شود. در صورت آسیب دیدن به بافت اپیتلیال، احتمال چسبندگی سلول باکتری کمتر می‌شود .از باکتری‌های پروبیوتیک برای درمان آسیب‌های دستگاه گوارش استفاده شده و جایگزین فلور از دست رفته آن می‌شود و با اصلاح تعادل میکروبی داخل روده، بافت آسیب دیده آن بهبود یافته و توانایی اتصال میکروارگانیسم‌ها به سطح سلول‌های روده افزایش می‌یابد. باکتری‌های پروبیوتیک با پاتوژن‌ها بر سر محل اتصال سلول‌های اپیتلیال رقابت می‌کنند، بنابراین بایستی درصد چسبندگی باکتری در حد استانداردی بالا باشد (فانتای و همکاران ۲۰۱۳). مشکلات مربوط به بررسی‌های بالینی آزمون چسبندگی موجب شد تا استفاده از مدل‌های شبیه‌سازی شده در مقیاس آزمایشگاهی رواج پیدا کند. به خصوص استفاده از توالی سلولی Caco- ۲ به منظور ارزیابی چسبندگی سویه‌های پروبیوتیکی به دستگاه گوارش، بسیار مورد توجه قرار گرفته است، زیرا در این شرایط خواص مورفولوژیکی و عملکردی سلول‌های روی سطح پرزهای روده کوچک به خوبی مشخص می‌شود. چنانچه میکروارگانیسم توانایی چسبندگی به

موکوز دستگاه گوارش را داشته باشد و مانع از اتصال پاتوژن‌ها به دستگاه گوارش شود، می‌توان ادعا کرد که خاصیت پروبیوتیکی دارد (فلاح و همکاران ۱۳۹۸). اووهاند و همکاران (۱۹۹۹)، درصد چسبندگی سه پاتوژن معروف غذایی *E. coli* ، *S. typhimurium* و *S. enteritidis*را به ترتیب ۱۳ و ۱/٤ و ۰/۵ درصد اعلام کردند و خاطر نشان کردند سویه‌هایی با بیش از این درصد چسبندگی پتانسیل پروبیوتیکی بالایی دارند. پتانسیل چسبندگی به سلول Caco-۲ سویه *Lev. brevis* NKN55 در مقابل *K. aerogenes*، ۱۰/۵۰ درصد بود. حجتی و همکاران (۲۰۲۰)، پتانسیل چسبندگی به سلول آدنوکارسینوم۲ -Caco، *Lev. brevis*gh104 را ۱۳/٤ گزارش کردند.

خاصیت ضدچسبندگی سلول

برخی از باکتری‌های پروبیوتیک می‌توانند از بدن انسان در برابر عفونت‌های بیماری‌زا به ویژه در کنترل و درمان انواع عفونت‌های گوارشی محافظت کنند، میکروارگانیسم‌ها باعث می‌شوند که بیماری‌های عفونی به سطوح مخاطی چسبیده یا به آن نفوذ کنند. این چسبندگی می تواند منجر به کلونیزاسیون شود که متعاقباً منجر به التهاب یا بیماری می‌شود. در این مطالعه پتانسیل *Lev. brevis* NKN55، در رقابت، مهار و جابه‌جایی چسبندگی در مقابل پاتوژن *K. aerogenes* ارزیابی شد. نتایج این ارزیابی در شکل ۵، نشان داده شده است. زمانی که *Lev. brevis* NKN55 به چاهک به طور همزمان با k. *aerogenes* اضافه شد، ۳۸/۹۰ درصد از چسبندگی پاتوژن کاهش یافت. زمانی که *Lev. brevis* NKN55 ابتدا به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۱ ساعت انکوباسیون، سویه بیماری‌زا اضافه شد، ۳۱/۲۰ درصد چسبندگی سویه پاتوژن کاهش یافت. زمانی که *K. aerogenes* برای اولین‌بار به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۱ ساعت انکوباسیون، *Lev. brevis* NKN55 به چاهک‌ها اضافه شد، سویه پروبیوتیک قادر به حذف ۱۹/۸۰ درصد از باکتری‌های پاتوژن متصل به سلول‌های Caco-۲ شد. حجتی و همکاران (۲۰۲۰)، نتایج ارزیابی سویه *Lev. brevis* gh104 را در مقابل *S. aureus* در رقابت ۵۲ درصد، در مهار ٤۷ درصد و در جابه جایی ۲۱ درصد گزارش کردند. توو و همکاران (۲۰۱۸)، خواص پروبیوتیکی برخی ازسویه‌های لاکتوباسیل را بر اساس توانایی آن‌ها در مهار چسبندگی پاتوژن و مهار تولید سیتوکین‌های پیش التهابی بررسی کردند. این پژوهشگران، ۱۱ سویه با پتانسیل مهار چسبندگی *E. coli* به سلول Caco-۲ را گزارش کردند. یکی از مهمترین مراحل مشخص شده برای چسبندگی روده توسط پاتوژن‌ها، توانایی آن‌ها برای چسبیدن به سطح روده از طریق پیلی موجود در سطوح باکتریایی است. سویه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس به‌صورت جداگانه به سلول‌های روده می‌چسبند، از چسبیدن و تهاجم باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند و عملکرد سد اپیتلیال را بهبود می‌بخشند.

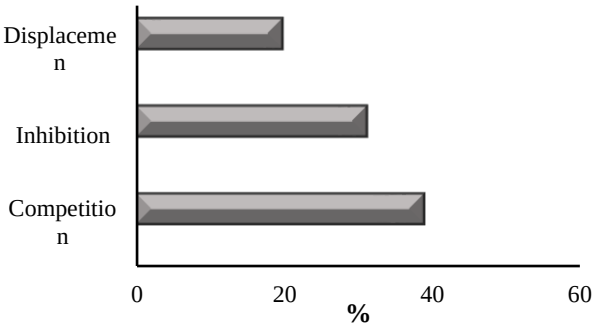

Fig 5. Anti-adhesion assays (competition, inhibition and displacement) of *Levilactobacillus brevis* NKN55 against *Klebsiella aerogenes*.

نتیجه گیری

فرآیند جمع‌آوری و شناسایی سویه‌های بومی از فرآورده‌های تخمیری هر نقطه از کشورمی‌تواند موجب حفظ ذخایر میکروبی و ژنتیکی شده و اطلاعات مفیدی برای کاربردهای علمی و تجاری بخصوص در زمینه صنایع لبنی و بحث پروبیوتیک‌ها و غذاهای عملگرا فراهم می‌نماید. در این مطالعه سویه *Lev. brevis* NKN55 جداسازی شده از ماست محلی از نظر پتانسیل پروبیوتیکی و ضدمیکروبی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد این سویه قابلیت بالایی در مهار باکتری‌های بیماری‌زا دارد. این باکتری غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی را به خوبی تحمل می‌کند. همچنین توانایی زنده ماندن در شرایط اسیدی را دارد. سویه مورد مطالعه در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج حساس بوده و قابلیت چسبندگی، هیدروفوبیستی، تجمع خودکار و انباشتگی مورد قبولی را از

خود نشان داد. با توجه به نتایج حاصل پیشنهاد می‌شود بعد از انجام تست‌های تاییدی بیشتر از این سویه به‌عنوان مکمل پروبیوتیکی در کشت‌های تخمیری و یا به‌عنوان کشت همراه در فرایند تولید محصولات غذایی تخمیری استفاده گردد.

تقدیر و تشکر

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

References

توکلی، م. حمیدی اصفهانی، ز. حجازی، م.ا. عزیزی، م.ح. عباسی، س. ۱۳۹۷. توانایی پروبیوتیکی سویه‌های الکتوباسیلوس جدا شده از پنیر محلی مازندران، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۱۱(٤ :)٦٨-٨٦

جوینده ح، علیزاده بهبهانی ب، نوشاد م، ۱٤۰۰. بررسی اثر اینولین بر زنده مانی لاکتوباسیلوس فرمنتوم۱۷-٤ در بستنی عملگر و ارزیابی ویژگی‌های میکروبی و فیزیکوشیمیایی آن، مجله علوم و صنایع غذایی ایران. شماره ۱۱۳. دوره ۱۰۰،۱۸-۹۱

حاجی قاسمی م ، مژگانی ن، ۱۳۹٤. شناسایی و بررسی خواص پروبیوتیکی باکتر های اسید لاکتیک بومی بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، مجله میکرو بشناسی پزشکی ایران سال ۹ شماره ٤

حجتی م، علیزاده بهبهانی ب، فلاح ف،۱۳۹۹. بررسی ویژگی‌های تکنولوژیکی و ضد میکروبی سویه لاکتوباسیلوس برویس gp۱۰٤ جدا شده از پنیر خیکی، فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی. دوره ۷، شماره۳، ۲٦-۱٤.

رامشگر م ، قمی مرزدشتی م ر، حسینی فرد م ، هاشمی کروئی م، طبری پور س ر،۱٤۰۰. تاثیر لاکتوباسیلوس پلانتاروم و برویس جدا شده از دستگاه گوارش سیاه ماهی (Capoeta.razii) و تاثیر آن بر شاخص‌های رشد و ایمنی ماهی کپور معمولی (Cyprinus carpio) در مقایسه با پروبیوتیک پریمالاک، فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری شماره ۵۳، جلد ۱٤ شماره ۲ ، ،صفحه ٦۳تا ۷٦.

شهرام پور د، خمیری م، رضوی س.ع.، کشیری م. ۱۳۹۷. بررسی تأثیر تنوع نژادی سویه‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از مواد غذایی مختلف، فعالیت ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و تجمعی آن‌ها، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران سال چهاردهم، شماره ۲، صفحات ۳۹-۵۳.

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

علیزاده بهبهانی ب، و نوشاد م. (۱٤۰۰). جداسازی و شناسایی سویه‌های لاکتوباسیلوس از پنیر محلی بهبهان و بررسی خواص فن‌آوری و ضد میکروبی آن‌ها در برابر عوامل بیماری‌زای غذایی، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۱٦(۱)، ۱۳۳-۱٤۲.

عیسوند حیدری ا، جوینده ح، حجتی م ، علیزاده بهبهانی ب، نوشاد م، ۱٤۰۰. بررسی خواص ضدمیکروبی و قابلیت زندهمانی Lactobacillus plantarum LZ95در شرایط اسیدی و صفراوی، نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران جلد ۱۷ ،شماره ٤ ، صفحه ٥٤۱-٥۳۳.

فلاح ف، مرتضوی س ع، طباطبایی یزدی ف، ۱۳۹۸. بررسی خواص پروبیوتیکی باکتری لاکتوباسیلوس برویس سویه PML۱بر پایه توانایی چسبندگی آن به سلول‌های اپیتلیال روده، فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی دوره ۵ شماره ۱،صفحات ۵۳-٤۱

مومن زاده س، جوینده ح، علیزاده بهبهانی ب، برزگر ح.۱٤۰۰. ارزیابی خواص پروبیوتیکی و ضد باکتریایی Lactobacillus fermentum SL163.، مجله تحقیقات علوم و صنایع غذایی ایران. جلد ۱۷، شماره ۲،ص. ۲۳۳- ۲٤۲.

نوری، ص. ناظری، س. حسینی، پ. ۱۳۹۷. جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم از ریزوسفر ریشه برنج لنجان، فصلنامه علمی-پژوهشی زیست شناسی میکروارگانیسم‌ها. ۹(۲۹ :)۹۱-۹۱

نوشاد م، علیزاده بهبهانی ب، حجتی م.۲۰۲۱. بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی و فنی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از دوغ بومی بهبهان، مجله تحقیقات صنایع غذایی. دوره ۳۱، شماره ٤.۲۰۲۱.

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

Aarti C, Khusro A, Varghese R, Arasu MV, Agastian P, Al-Dhabi NA, et al. In vitro studies on probiotic and antioxidantproperties of *Lactobacillus brevis* strain LAP2 isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India. LWT.2017;86:438-46.

Abushelaibi A, Al-Mahadin S, El-Tarabily K, Shah N. P & Ayyash M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. LWT-Food Science and Technology 79, 316–325. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.04.

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

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

Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Falah, F., & Vasiee, A. (2020). Gamma-aminobutyric acid production by Lactobacillus brevis A3: Optimization of production, antioxidant potential, cell toxicity, and anti-microbial activity. *Food Science & Nutrition, 8*(10), 5330-5339. doi:https://doi.org/10.1002/fsn3.1838

Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Vasiee, A., & 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.

Ayyanna R, Ankaiah D, Arul V. Anti-inflammatory and antioxidant properties of probiotic bacterium *Lactobacillus mucosae* AN1 and *Lactobacillus fermentum* SNR1 in Wistaralbino rats. Frontiers in microbiology 2018; 9:3063.

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

Boricha A. A., Shekh S. L, Pithva S. P, Ambalam P. S & Vyas B. R. M. (2019). In vitro evaluation of probiotic properties of Lactobacillus species of food and human origin. LWT-Food Science and Technology 10*6*, 201–208. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.021

Brink B, Damink C, Joosten H. M. L. J. & Huis in t'Veld, J. H. J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. International Journal of Food Microbiology 11, 73–84.

Fadare O, Anyadike C, Momoh A & Bello T. (2023). Antimicrobial properties, safety, and probiotic attributes of lactic acid bacteria isolated from Sauerkraut. African Journal of Clinical and Experimental Microbiology *24*, 61–72.

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

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

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

Falah F, Zareie Z, Vasiee A, Tabatabaee Yazdi F, Mortazavi SA, Alizadeh Behbahani B. Production of synbiotic ice-creams with Lactobacillus brevis PML1 and inulin: functional characteristics, probiotic

viability, and sensory properties. Journal of Food Measurement and Characterization. 2021[a] Dec;15(6):5537-46.

Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Munoz-Quezada S, Gil A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. British journal of nutrition. 2013 Jan;109(S2): S35-50.

Fossi B. T, Ekabe D. E, Toukam L. L, Tatsilong Pambou H. O, Gagneux-Brunon A, Nkenfou Nguefeu C et al. (2022). Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional cameroonian palm wine and corn beer exhibiting cholesterol lowering activity. Heliyon, 8, Article e11708

Hamed E. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria as probiotic. Annals of Agricultural Science Moshtohor 2021, *59*, 311–322

Jena P. K, Trivedi D, Thakore K, Chaudhary H, Giri S. S & Seshadri S. (2013). Isolation and characterization of probiotic properties of lactobacilli isolated from rat fecal microbiota. Microbiology and Immunology 57(6), 407–416.https://doi.org/10.1111/1348-0421.12054.

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

Kardooni, Z., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., & Noshad, M. (2023). Probiotic viability, physicochemical, and sensory properties of probiotic orange juice. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *17*(2), 1817-1822.

Kelly M. T, Blaise A & Larroque, M. (2010). Rapid automated high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of amino acids and biogenic amines in wine, fruit and honey. Journal of Chromatography 1217, 7385–7392.

Kim S, Lee J.Y, Jeong Y, & Kang Ch. 2022. "Antioxidant Activity and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria" Fermentation 8, no. 1: 29. https://doi.org/10.3390/fermentation8010029

Kocabay, S. (2023). Evaluation of probiotic properties of *Levilactobacillus brevis* isolated from hawthorn vinegar. Archives of Microbiology *205*, 258

Lin M.Y, Yen C.L. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1999, 47, 1460–1466

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

Montoro BP, Benomar N, Gómez NC, Ennahar S, Horvatovich P, Knapp CW, et al. Proteomic analysis of Lactobacillus pentosus for the identification of potential markers involved in acid resistance and their influence on other probiotic features. Food Microbiology 2018; 72:31-8

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

Munir A, Javed G.A, Javed S, Arshad N.2022. *Levilactobacillus brevis* from carnivores can ameliorate hypercholesterolemia: In vitro and in vivo mechanistic evidence. Journal of Applied Microbiology Volume 133, Issue 3, 1 September 2022, Pages 1725–1742, https://doi.org/10.1111/jam.15678.

Mushtaq M , Arshad N, Hameed M, Munir A, Javed G.A and Rehman A.2023. Lead biosorption efficiency of *Levilactobacillus brevis* MZ384011 and *Levilactobacillus brevis* MW362779: A response surface based approach. Saudi Journal of Biological Sciences Volume 30, Issue 2, 103547.

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

Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Grönlund MM, Isolauri E, Salminen SJ. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. International Dairy Journal. 1999 Sep 1;9(9):623-30.

Patel J, Sharma M & Ravishakar S. (2011). Effect of curli expression and hydrophobicity of *Escherichia coli* O157: H7 on attachment to fresh produce surfaces. Journal of Applied Microbiology *110*(3), 737–745.https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04933.

Pieniz S andreazza R, Anghinoni T, Camargo F, Brandelli A. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. Food Control.2014;37:251-6.

Rokhtabnak A, Khaleghi M, Sasan H.A. 2015. Isolation and identification of Lactobacillus bacteria with probiotic potential from traditional dairy in Kerman. Iranian Journal of Medical Microbiology Volume 10, Number 1.

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

Shangpliang H. N. J & Tamang, J. P. (2023). Genome analysis of potential probiotic Levilactobacillus brevis AcCh91 isolated from Indian home-made fermented milk product (Chhurpi). Probiotics and Antimicrobial Proteins. https://doi.org/10.1007.

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

Tang W, Li C, He Z, Pan F, Pan S, Wang Y.2018. Probiotic properties and cellular antioxidant activity of Lactobacillus plantarum MA2 isolated from Tibetan Kefir grains. *P*robiotics Antimicrob. Proteins 2018, 10, 523–533

Tuo Y, Song X, Song Y, Liu W, Tang Y, Gao Y, et al. Screening probiotics from Lactobacillus strains according to their abilities to inhibit pathogen adhesion and induction of pro-inflammatory cytokine IL-8. Journal of dairy science. 2018; 101:4822-9.

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

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

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

Vasiee AR, Mortazavi A, Tabatabaei-Yazdi F, & Edalatian MR. 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.

Vougiouklaki D, Tsironi T, Papaparaskevas J, Halvatsiotis P & Houhoula D. (2022). Characterization of lacticaseibacillus rhamnosus, Levilactobacillus brevis and lactiplantibacillus plantarum metabolites and evaluation of their antimicrobial activity against food pathogens. Applied Sciences, 12, 660.

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

Zibaei-Rad, A., Rahmati-Joneidabad, M., Alizadeh Behbahani, B., & 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.