پتانسیل پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس های جدا شده از ماست لیقوان تبریز

محمود توکلی[1*]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران دانشگاه زابل

(تاریخ دریافت: ۹۵ /۱۰/۰۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۹)

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی پتانسیل پروبیوتیکی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* ۵ نمونه ماست جمع‌آوری شده از مناطق روستایی لیقوان می باشد. در این پژوهش با استفاده ازآزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی ۱۰۰ سویه لاکتوباسیلوس تشخیص داده شد. سپس ویژگی‌های پروبیوتیکی آن ها از قبیل مقاومت به شرایط مشابه دستگاه گوارش، مقاومت به نمک‌های صفراوی، ممانعت از رشد ریزاندامگان بیماری‌زا و تحمل آنتی‌بیوتیک‌ها مورد آزمون قرار گرفت. در این تحقیق ۳٤ جدایه شرایط اسیدی و نمک صفراوی را تحمل نمودند. از بین این ۳٤ سویه ، ۱۵ سویه منتخب *لاکتوباسیلوس* Y1 تا Y15 توانایی پروبیوتیک خوبی را نشان دادند. جدایه های Y1، Y5 , Y13 نسبت به غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی مقاوم بودند. تمامی جدایه ها به آنتی بیوتیک های ونکومایسین، استرپتومایسین و جنتامایسین مقاوم بودند. جدایه Y12 از رشد ریزاندامگان بیماری‌زا جلوگیری نمود. جدایه Y3 بالاترین زنده مانی (۸۸/٤۵ ٪) و جدایه Y9 کمترین زنده مانی در شرایط دستگاه گوارش را نشان دادند. تمام سویه ها حساسیت کمی نسبت به نمک های صفراوی کنژوگه نشان دادند. سویه های Y1, Y5, Y6, Y10, Y11, Y15 فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز بالایی نشان دادند. جدایه Y7 و متعاقب آن Y6 و Y2 بیشترین($P<0.05$) مقدار پراکسید هیدروژن تولید نمودند. بیشتر جدایه ها آبگریز سطح سلولی پایین نشان دادند و جدایه Y6 بالاترین ($P<0.05$) آبگریز سطح سلولی را نشان داد. جدایه های ماست لیقوان توانایی پروبیوتیکی خوبی را نشان دادند ولی بایستی آزمون‌های in vitro و *in vivo* بیشتری انجام گیرد.

کلید واژگان: خواص پروبیوتیکی، لاکتوباسیلوس، ماست لیقوان

*مسئول مکاتبات: mtavakkoli.z@gmail.com

۱- مقدمه

پروبیوتیک دامنه وسیعی از ریزاندامگان به‌ویژه باکتری‌ها و همچنین مخمرها را شامل می‌شوند. این ریزاندامگان با چسبیدن به دیواره اپیتلیوم روده اثرات مفیدی در میزبان ایجاد می‌کنند. پروبیوتیک ها طبق گزارش ها باعث تقویت سامانه ایمنی بدن، کاهش کلسترول، بهبود تحمل لاکتوز و جلوگیری از بعضی سرطان ها، همچنین موجب بهبود جذب مواد معدنی به ویژه کلسیم، تقویت توده استخوان و جلوگیری یا به تاخیر انداختن پوکی استخوان، کاهش خطر تصلب شریان، کاهش ناراحتی هایی از قبیل اسهال و کاهش کلسترول خون می شوند[۱]. یکی از مشکلات سویه‌های پروبیوتیک‌ها در مواد غذایی عدم تحمل شرایط محصول می باشد. همچنین ایجاد عطر و طعم نامطلوب در محصولات لبنی، بازارپسندی آنها را دچار مشکل نموده است. از این رو جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک از فراورده‌های لبنی محلی نه تنها منجر به کشف باکتری‌های پروبیوتیک جدید می‌شود، بلکه می‌تواند تولید محصولات پروبیوتیک بومی با خواص جدید را میسر سازد.

اولین قدم در معرفی سویه های پروبیوتیک جدید، جداسازی و انتخاب سویه های مناسب از یک جمعیت میکروبی پیچیده می باشد. این کار بوسیلهٔ جستجو از مجموعه بانک های میکروبی، جداسازی از محصولات لبنی سنتی و یا جداسازی از انسان و حیوانات سالم انجام می گیرد. ابتدا جداسازی سویه ها با کشت آنها در شرایط آزمایشگاهی و بررسی ویژگی های خاص این گروه آغاز شده و سپس مرحلهٔ شناسایی بهترین سویه ها به منظور کاربرد صنعتی انجام می شود [۲].

برای تایید پروبیوتیک ها به عنوان افزودنی در محصولات غذایی آزمون های *in vitro* مانند خصوصیات تکنولوژیکی پروبیوتیک‌ها در فرآورده غذایی (شامل بقاء در زمان مصرف، خواص حسی و ویژگی های اقتصادی محصول) و آزمون های *in vivo* شامل ایمنی و اثر پروبیوتیک ها بر موجود زنده (موش آزمایشگاهی و انسان) انجام می‌شود [۳].

آب و هوای متنوع در مناطق مختلف ایران امکان تولید فرآورده‌های لبنی متنوع را فراهم کرده است. از جمله این محصولات می توان به پنیر لیقوان، ماست لیقوان، ماست چکیده، ماست خیک، پنیر خیک، دوغ گدوک، دوغ محلی، کشک زابل و ... اشاره نمود. لذا در این پژوهش هدف جداسازی و تعیین ویژگی های پروبیوتیکی ریزاندامگان با توانایی پروبیوتیک از ماست لیقوان می باشد.

سویه‌های جدید پروبیوتیک باید نسبت به شرایط سخت دستگاه گوارش انسان مقاوم باشند. لذا در این تحقیق آزمون‌های *in vitro* بر سویه‌های جدا شده از ۵ نمونه ماست لیقوان مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی، معرف‌ها و محیط کشت

گلیکوکولیک اسید[1] (GC)، گلیکو داکسی کولیک اسید[2] (GDC)، تاروکولیک اسید[3] (TC) و تارودااکسی کولیک اسید[4] (TDC) از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. O-nitrophenyl β-galactopyranoside (ONPG) از شرکت Oakville کانادا تهیه شد. پپسین، تریپسین، نمک صفراوی (Oxgall)، از شرکت سیگما آمریکا خریداری گردید. گلیسرول، نمک طعام، بافر سدیم فسفات، سدیم تیوگلیکولات و هیدروکربن هگزان از شرکت مرک آلمان خریداری شد. آموکسیسیلین، سفتاریکسن، کلرامفنیکل، اریترومایسین، جنتامایسین، استرپتومایسین، تتراسایکلین و ونکومایسین از موسسه تحقیقات سرم و واکسن رازی تهیه شد. محیط کشت MRS از شرکت مرک آلمان و محیط‌های MHA[5] و BHI agar[6] از شرکت سیگما آمریکا تهیه شد.

۲-۲- جمع‌آوری نمونه‌ها

در این تحقیق نمونه های ماست محلی به طور تصادفی از منطقه روستایی لیقوان (آذربایجان شرقی- تبریز) جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها تحت شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل گردید و تا شروع زمان آزمایش‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

1. Glycocholic acid
2. Glicodeoxycholic acid
3. Taurocholic acid
4. Taurodeoxycholic acid
5. Muller Hinton Agar
6. Brain Heart Infusion Soft Agar

۲-۳- جداسازی سویه‌های لاکتوباسیلوس از ماست لیقوان

به منظور ترمیم سلول های آسیب دیده در اثر جابجایی نمونه ها از تبریز به کرج،گرم نمونه ماست تازه در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت MRS broth سترون تلقیح و توسط دستگاه استومیکر هم زده شد. نمونه ها به مدت ۲٤ ساعت دمای ۳۷ °C گرمخانه گذاری شد. ۲۵ میلی لیتر از محیط کشت ۲٤ ساعته قبلی به مدت ۲۰ دقیقه دمای ٤ °C و ۱۰۰۰g سانتریفوژ گردید. به منظور حذف ریزاندامگان حساس به شرایط اسیدی، توده سلول در ۱۰ میلی‌لیتر محلول فسفات بافر با pH= ۲/۵ (توسط ۵M HCl تنظیم شد) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ ° C گرمخانه گذاری شد. توده سلولی دو بار توسط محلول رینگر شسته شد. سپس سریال های رقت تهیه و عمل کشت سطحی جدایه ها از رقت های ۵-، ٦-، ۷- و ۸- در محیط MRS agar در دمای ۳۷°C به مدت ٤۸ ساعت به‌صورت بی‌هوازی انجام شد [٤].

آزمون های تشخیصی و بیوشیمیایی از قبیل رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، تحرک، اندوسپور و تخمیر قندها انجام شد [۵]. کلنی‌های کاملاً مجزا هر پلیت محیط MRS Agar بر اساس رنگ، شکل و اندازه انتخاب شده و جهت خالص سازی سه بار مورد کشت مجدد قرار گرفتند. سپس محیط کشت MRS broth تازه همراه با ۱۵٪ گلیسرول به سویه‌ها لاکتوباسیلوس اضافه شده و تا زمان انجام آزمایشات، در دمای ۸۰- °C نگه‌داری شدند.

۲-٤- اندازه‌گیری مقاومت به نمک‌های صفراوی

توانایی رشد سویه‌های لاکتوباسیلوس در نمک‌های صفراوی شامل GC، GDC، TC و TDC مورد ارزیابی قرار گرفت. کلنی‌های منفرد در محیط MRS agar در ۵-۲ میلی‌لیتر محلول نمک ۰/۸۵ ٪ سترون با دانسیته معادل مک فارلند شماره ۱ سوسپانسیون شد. در مرحله بعد ۱۰ µL از سوسپانسیون لاکتوباسیلوس تهیه شده در پلیت‌های حاوی نمک‌های صفراوی به صورت نقطه‌ای تلقیح شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷°C تحت شرایط بی‌هوازی گرمخانه گذاری شد و رشد کلنی‌ها بعد از ۲٤ تا ٤۸ ساعت ثبت گردید [٦].

سرعت رشد سویه‌ها با کشت سویه‌ها در محیط MRS broth حاوی ۰/۳ ٪ نمک صفراوی (Oxgall) انجام شد. برای سنجش سرعت رشد طبق روش کدورت سنجی در پلیت های ۹٦ خانه و توسط دستگاه میکروپلیت ریدر مدل infinite M200 PRO TECAN (سوییس)خوانش انجام گردید[۷].

۲-۵- تعیین تحمل به آنتی‌بیوتیک‌ها

تحمل سویه‌های لاکتوباسیلوس به دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به روش انتشار دیسک[1] انجام شد . توسط سوآب سترون از محلول حاوی (10^7-10^8CFU/ml) سلو ل از هر کدام از سوسپانسیون‌های لاکتوباسیلوس بر روی محیط MHA کشت داده شد. سپس دیسک‌های مختلف آنتی‌بیوتیک بر روی محیط کشت قرار گرفت و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری شد. قطر هاله عدم رشد (mm) اندازه‌گیری گردید و نتایج به صورت سویه مقاوم (≤۱۵ mm)، نیمه حساس (۲۰mm-۱٦) و حساس (≥ ۲۱ mm) گزارش شد [۸].

۲-٦- فعالیت ضد میکروبی

روش آگار نقطه[2] به منظور تعیین توانایی سویه‌ها برای ممانعت از رشد ریزاندامگان بیماریزا با منشاء غذایی از قبیل *سالمونلا انتریکا* (*Salmonella enterica*)، *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) ، *استافیلوکوکوس ارئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) ، *انتروکوکوس هیرا* (*Enetrococcus hirea*) استفاده شد. ریزاندامگان بیماری زا از کلکسیون میکروبی پژوهشکده بیوتکنوژی کشاورزی کرج تهیه شد. ۲µL از کشت ۲٤ ساعته سویه‌ها لاکتوباسیلوس به صورت نقطه‌ای در سطح محیط کشت MRS agar کشت شد و به صورت بی‌هوازی در دمای ۳۷ °C به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شد و سپس سلول‌ها توسط کلروفرم به مدت ۳۰ دقیقه غیرفعال شدند. ۱۰mL محیط BHI agar (۰/۷ ٪) با ۱۰۰µL از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا فعال شده (محیط کشت Muller Hinton broth به مدت ۱۸ساعت دمای ۳۷ درجه سانتیگراد) مخلوط شده و بر روی سطح محیط MRS agar پخش گردید. محیط‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷°C در شرایط هوازی گرمخانه گذاری شد. ممانعت و عدم تشکیل هاله

1. Disk diffusion
2. Spot agar

واضح یا هاله ۱mm > به صورت (±)، هاله ۱mm < به صورت (+)، هاله بین ۲ و ۵ میلی‌متر (++) و عدم تشکیل هاله (–) مشخص گردید [۳].

۲-۷- زنده‌مانی سویه‌ها در شیره مشابه معده و روده

در این روش به طور خلاصه لاکتوباسیلوس کشت ۱۸ ساعته توسط سانتریفوژ ۲۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه دمای ۴°C رسوب داده شد و توسط PBS با pH ۷/۴ دو مرتبه شستشو گردید. شیره مشابه معده و روده به طور تازه تهیه گردید. برای تهیه شیره معده ۳mg/mL پپسین (۱:۳۰۰۰) با بافر فسفات-سیترات ۱۰۰ میلی مولار با pH برابر ۲/۵ مخلوط شد. ۱ mL از سلول لاکتوباسیلوس با ۹ میلی لیتر شیره معده مخلوط گردید. مقاومت سویه‌ها بر اساس شمارش سلولی با تهیه سریال رقت برای هر جدایه در محیط کشت MRS Agar بعد از ۲ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ °C به دست می‌آید. سپس سلول‌ها جمع‌آوری گردیده و در داخل شیره مشابه روده که با افزودن ۱ mg/mL تریپسین به بافر قلیایی ۱۰۰ میلی مولار pH =8 (Na_2HPO_4 و NaH_2PO_4) تهیه گردید. نمونه‌ها به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری گردید و شمارش سلول‌های زنده انجام شد [۷].

مانی‌زنده (%) =Log N1/ Log N0×۱۰۰%

N_1 – سلول های زنده پروبیوتیک بعد از انجام تیمار تعداد کل شرایط دستگاه گوارش

N_0 – سلول های زنده پروبیوتیک اولیه‌تعداد کل

۲-۸- غیر مزدوج کردن نمک های صفراوی:

در این آزمون ۰/۵درصد از نمکهای سدیم GC، GDC، TC و TDC به محیط MRS agar اضافه و سترون گردید. جدایه ها به روش سطحی کشت شدند و به صورت بی‌هوازی به مدت ۷۲ ساعت دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. نتیجه مثبت با تشکیل رسوب نمک های صفراوی (هاله کدر) در اطراف جدایه گزارش گردید [۲].

۲-۹- اندازه گیری فعالیت β-گالاکتوزیداز

فعالیت بتا-گالاکتوزیداز جدایه های لاکتوباسیلوس به وسیله فیلتر های کاغذی آغشته به ا-نیترو فنیل بتا-گالاکتوپیرانوزید (OPNG) انجام شد. به طور خلاصه جدایه های باکتری فعال شده در محیط MRS agar کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به صورت بی هوازی گرمخانه گذاری شد. یک کلنی از هر محیط برداشته شد در یک ویال حاوی دیسک های OPNG و ۰/۱ میلی لیتر محلول استریل کلرید سدیم ۰/۸۵ ٪ افزوده شد و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶ ساعت گرمخانه گذاری شد و در فواصل ۱ ساعت نمونه ها ارزیابی گردید. خارج شدن ا-نیترو فنول به صورت رنگ زرد نشان دهنده نتیجه مثبت و فعالیت تولید آنزیم بتا- گالاکتوزیداز می باشد [۸].

۲-۱۰- ارزیابی آبگریز سطح سلولی

توانایی چسبیدن جدایه های لاکتوباسیلوس به هیدروکربن های هگزادکان به صورت *in vitro* ارزیابی شد. درصد کاهش جذب فاز آبی با سوسپانسیون اولیه مقایسه شد به صورت بخشی از سلول های چسبیده شده گزارش گردید. درصد آبگریزی سطح سلول از طریق رابطه زیر بدست آمد (معادله ۱):

$$CSH\ (\%) = 100 \times \left(1 - \frac{OD_b}{OD_a}\right)$$

که در آن OD_a و OD_b به ترتیب جذب در (۴۰۰ نانومتر) قبل و بعد از از مخلوط شدن با محلول هیدروکربن می باشد (Rosenberg *et al*., 1980).

۲-۱۱- توانایی تولید پراکسید هیدروژن

جدایه های لاکتوباسیلوس در محیط کشت Tryptic soy broth-yeast extract در دمای ۳۰ °C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید.

۱ میلی لیتر محلول آبی پراکسیداز (۱٪ وزنی/حجمی) و ۱ میلی لیتر محلول o- دی آنزیدین آبی مخلوط کرده در یک ویال ریخته و ۵ میلی لیتر مایع رویی فاقد سلول به آن اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. در آخر واکنش شیمیایی با افزودن ۰/۲ میلی لیتر HCl 5M

غیرفعال گردید و جذب نمونه ها در طول موج ٤٠٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (U-5100 model, Hitachi, Japan) قرایت گردید. نمونه شاهد با افزودن ۵ میلی لیترsoy broth-yeast extract به جای مایع رویی تهیه شد [۱۰].

۲-۱۲- روش‌های تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

در ایـن تحقیـق از روش آمـاری multiattribute decision-making برای مشخص کردن سویه‌های برتر استفاده گردیـد. از نرم‌افزار Excel 2007 برای رسم نمودار استفاده شـد. از آزمـون one-way Anova بـرای مقایـسه مکیـانگین هـا در سـطح $p<0.05$ استفاده شد. نتایج میانگین ± انحراف معیار سـه تکـرار می باشد.

۳- یافته‌ها

۳-۱- اندازه‌گیری مقاومت به نمک‌های صفراوی

مقاومت لاکتوباسیوس‌ها نسبت به غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی (۰/۳ تا ۲ ٪) مورد آزمون قرار گرفت. جدول ۱ زمان تأخیر بین ۰/٤٤ تا ۱/٦۹ را نمایش می‌دهد. برای محاسبه زمان تاخیر زمان مورد نیاز بر حسب ساعت برای رسیدن کدورت محیط کشت فاقد نمک صفراوی به ۰/۳ واحد از زمان مورد نیاز برای نمونه حاوی نمک صفراوی در کدورت ۰/۳ کم می شود. سویه Y5 با زمان تأخیر ۰/٤٤ ساعت کوتاه ترین و سویه Y9 با زمان تأخیر ۱/٦۹ ساعت طولانی‌ترین زمان تأخیر را نشان داد. بنابراین سویه Y5 در محیط کشت MRS+0.3% bile قادر هست مانند محیط کشت MRS رشد نماید و سازگاری بالایی را نشان می‌دهد. با توجه به جدول ۱ سویه Y5 همچنین نسبت به غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی مقاوم می‌باشد. بر اساس نتایج جدول ۱ ، ۱۵ سویه قابلیت رشد در غلظت ۰/۳ و ۰/۵٪، ۵ سویه در غلظت ۱ و ، ۳ سویه در غلظت ۲٪ نمک صفراوی را دارند. سه سویه Y1، Y5و Y13 قابلیت رشد در تمام غلظت‌ها را دارند. نتایج نشان داد که جدایه های مورد استفاده در این آزمون مقاومت خوبی به نمک های صفراوی دارند و لاکتوباسیلوس های جدا شده از ماست لیقوان قادرند دامنه وسیعی از نمک های صفراوی را تحمل نمایند. یافته های دانشمندان نشان می دهد، غلظت های نمک های صفراوی در دستگاه گوارش ثابت نیست و در ساعات اولیه هضم غذا بین ۱/۵ تا ۲ ٪ (w/w) متغیر است و بعد از آن به ۰/۳ ٪ کاهش می یابد [۳].

مطالعات دانشمندان نشان می دهند که غلظت متوسط نمک های صفراوی در روه انسان حدود ۰/۳ ٪ می باشد. بالاترین سطح مقاومت *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* ACS-DC به نمک های صفراوی ۲٪ گزارش شده است. *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* AD1 قادر به رشد در حضور نمک های صفراوی ۱٪ بوده است و بعد از ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری ۷۵/٤ ٪ زنده مانی داشته است [۳]. توکلی و همکاران ۲۰۱٦ زمان تاخیر رشد سویه های لاکتوباسیلوس نمونه های پنیر محلی مازندران را بین ۰/۱۱ تا ۲/٦۵ ساعت گزارش نمودند[۱۱].

نمک‌های صفراوی لیپیدهای غشایی را حل نموده و باعث خروج محتویات داخل سلول می شود و در نهایت مرگ سلول به همـراه دارد. بنابراین مقاومت به نمک‌های صفراوی یکی از ضروری‌ترین ویژگی پروبیوتیک‌ها می‌باشد که زنده‌مـانی و فعالیـت آنهـا را در روده کوچک حفظ می‌نماید. پروبیوتیک‌هـا بـا تولیـد آنـزیم‌هـای آبکافت کننده نمک‌های صـفراوی اثـرات آنهـا را خنثـی کـرده و سـطح کلـسترول سـرم خـون بیمـاران کلـسترول بـالا را پـایین می‌آورند. بیشتر مطالعات انجـام شـده روی مقاومـت سـویه‌هـای لاکتوباسیلوس در مقابل نمک‌های صفراوی تاخیر رشد در محـیط کشت حاوی نمک‌های صفراوی را نشان می‌دهد که با نتـایج بـه دست آمده در این تحقیق مشابه بود [۱۱].

Table 1 Bile resistance of fifteen LAB isolated from Lighvan yoghurt samples

Strain	Bile tolerance assay				
	Lag time (h), 0.3% bile	Growth plate [a]			
		0.3% bile	0.5% bile	1.0% bile	2.0% bile
Y1	0.96±0.04	+	+	+	+
Y2	1.63±0.53	+	+	–	–
Y3	1.23±0.15	+	+	–	–
Y4	0.87±0.09	+	+	–	–
Y5	0.44±0.06	+	+	+	+
Y6	1.32±0.26	+	+	+	–
Y7	1.41±0.08	+	+	–	–
Y8	0.57±0.11	+	+	+	–
Y9	1.69±0.13	+	+	–	–
Y10	0.67±0.11	+	+	–	–
Y11	1.45±0.18	+	+	–	–
Y12	1.32±0.12	+	+	–	–
Y13	1.27±0.24	+	+	+	+
Y14	0.48±0.06	+	+	–	–
Y15	1.15±0.25	+	+	–	–

. [a] Growth plate: – = no growth; + = positive growth.

۳-۲- تعیین تحمل به آنتی‌بیوتیک‌ها

جدول ۲ قابلیت تحمل سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از ماست لیقوان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به روش انتشار دیسک را نمایش می‌دهد. همان طور که در این جدول مشاهده می‌شود تمام سویه‌ها نسبت به ونکومایسین ، استرپتومایسین و جنتامایسین مقاوم هستند. سویه به تمام آنتی بیوتیک های تحقیق مقاوم می‌باشد (جدول ۲). لذا این سویه‌می‌تواند به مصرف بیمارانی که تحت درمان با این آنتی‌بیوتیک ها هستند قرار بگیرد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که قابلیت تحمل سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از ماست لیقوان به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف متفاوت می‌باشد. آریسی و همکاران در سال ۲۰۰٤ مقاومت بالای تمام جدایه های لاکتوباسیلوس به استرپتومایسین را گزارش نمود [۱۲].

منشاء مقاومت به آنتی بیوتیک توسط لاکتوباسیلوس ها را می توان به استفاده زیاد این ترکیبات در درمان بیماری ها در انسان و دام دانست[۱۳]. مقاومت ذاتی برخی از جدایه ها به آنتی بیوتیک‌ها یک مزیت برای آنها محسوب می شود زیرا در زمان بیماری که فرد این آنتی بیوتیک ها را مصرف می کند جدایه ها قادر هستند نقش پروبیوتیکی خود را حفظ نمایند [۱٤].

مقاومت جدایه های لاکتوباسیلوس به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی (ونکومایسین، استرپتومایسین و جنتامایسین) توسط محققین زیادی گزارش شده است [۱۷،۱٦،۱۵،۱٤]. جدایه های لاکتوباسیلوس نسبت به آنتی بیوتیک هایی که در سنتز پروتئین نقش دارند از قبیل کلرامفنیکل، اریترومایسین و تتراسایکلین حساس هستند [۳].

مقاومت به آنتی بیوتیک ها ممکن است به صورت ذاتی در بین جنس و گونه های یک باکتری و یا به طور اکتسابی توسط جهش ایجاد گردد و اگر به صورت انتقال افقی[1] باشد در مقایسه وقتی مقاومت در اثر اضافه شدن یک ژن ایجاد گردد، احتمال خطر کمتری وجود دارد. از طرف دیگر مقاومت جدایه های لاکتوباسیلوس به آنتی بیوتیک ها بقاء آن ها را در روده در اثر درمان با آنتی بیوتیک ها افزایش می دهد [۳]. همچنین می توان نتیجه گرفت که جدایه های ماست لیقوان ژن مقاومت را حداقل در مورد آنتی بیوتیک هایی که نسبت به آن حساس هستند انتقال نمی دهند. در مصرف پروبیوتیک ها حاوی سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک خطر انتقال ژن های مقاومت به ریزاندامگان بیماری زا وجود دارد لذا انجام آزمون های استاندارد برای تعیین مقاومت سویه ها به آنتی بیوتیک ضروری به نظر می رسد.

1. Horizontal spred

Table 2. Susceptibility of fifteen LAB isolated from Lighvan yoghurt to antibiotics using the disc diffusion method

Strain	Antibiotics [a,b]							
	V30	S10	GM10	T30	CRO30	Ch30	AMX25	E15
Y1	R	R	R	S	S	S	S	S
Y2	R	R	R	MS	MS	R	S	R
Y3	R	R	R	S	S	S	S	S
Y4	R	R	R	R	MS	S	MS	R
Y5	R	R	R	S	S	S	S	R
Y6	R	R	R	S	S	MS	S	S
Y7	R	R	R	S	S	S	S	MS
Y8	R	R	R	R	R	S	R	R
Y9	R	R	R	MS	R	R	R	MS
Y10	R	R	R	MS	S	S	MS	MS
Y11	R	R	R	MS	MS	S	MS	MS
Y12	R	R	R	R	R	MS	MS	R
Y13	R	R	R	MS	S	S	S	S
Y14	R	R	R	S	S	S	S	S
Y15	R	R	R	MS	S	S	S	MS

[a] Antibiotics (Disk potency): V30 = Vancomycin (30 µg); S10= Streptomycin (10 µg) ; GM10 = Gentamicin (10 µg); T30 = Tetracycline (30 µg); CRO30 = Ceftriaxone (30 µg); Ch30 = Chloramphenicol (30 µg); AMX25 = Amoxicillin (25 µg); E15 = Erythromycin (15 µg);
[b] R: resistance; MS: moderate susceptibility; S: susceptibility.

۳-۳- فعالیت ضد میکروبی

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که به غیر از جدایه Y2، Y13 و Y14 بقیه جدایه ها قادر به مهار اشرشیاکلی بودند. جدایه های Y3، Y4، Y9، Y10 و Y12 قادر به مهار *سالمونلا انتریکا* بودند. جدایه های Y1، Y3 و Y10 در مقابل *انترکوکوس هیرا* حساس بودند. جدایه های Y3، Y10 و Y12 از رشد *استافیلوکوکوس ارئوس* ممانعت نمودند. جدایه های Y4، Y9، Y10 و Y13 نسبت به *سودوموناس ائروژینوزا* حساس بودند. جدول ۳ نشان داد که سویه‌های لاکتوباسیلوس تحقیق حاضر قابلیت خوبی در مهار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا دارد. مواد ضد میکروبی که توسط پروبیوتیک ها به صورت جداگانه و یا ترکیبی تولید می شود اثر کشندگی بر روی سایر ریزاندامگان ها دارد.

امروزه نگرانی‌ها در مورد ریزاندامگان بیماری‌زا انسان در حال افزایش است. بنابراین کشف ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی اهمیت فراوانی دارد. به طور کلی فعالیت ضد میکروبی در اثر تولید متابولیت های مختلف از قبیل اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، اتانول، استوئین و باکتریوسین‌ها و غیره انجام می شود. از بین این ترکیبات اسید لاکتیک، اسید استیک، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین‌ها قوی ترین ترکیبات ضد میکروبی هستند که توسط پروبیوتیک ها تولید می شوند [۳]. از بین اسیدهای آلی اسید لاکتیک، مهمترین متابولیت سلولی است که از تخمیر قند بدست می آید. اسید لاکتیک از طریق کاهش pH و نفوذ پذیر کردن دیواره سلولی اثر بازدارندگی روی رشد ریزاندامگان بیماری زا را دارد [۱۲]. اثر مهارکنندگی سایر اسیدهای آلی عمدتا توسط شکل غیر یونیزه است ، که از غشاء سلول به سمت سیتوزول بیشتر قلیایی انتشار می یابد و در فعالیت متابولیک ضروری اختلال ایجاد می کند. اثرات سمی لاکتیک و استیک اسید شامل کاهش pH درون سلولی و اختلال در فعالیت غشاء است [۱۸].

Table 3 Antimicrobial activity of fifteen LAB isolated from Lighvan yoghurt

Lactic Strain	Inhibition profile spot test[a]				
	Pathogen inhibition				
	I	II	III	IV	V
Y1	++	–	–	±	++
Y2	±	–	++	–	++
Y3	+	++	–	++	±
Y4	++	++	±	–	–
Y5	++	–	+	–	++
Y6	++	–	++	±	++
Y7	++	–	++	±	++
Y8	++	–	++	–	++
Y9	++	++	++	–	–
Y10	++	++	–	++	–
Y11	++	–	++	–	++
Y12	++	++	++	++	++
Y13	–	–	++	–	–
Y14	–	±	++	–	++
Y15	++	±	++	±	++

[a]Indicators: I = *Escherichia coli* PTCC5052; II= *Salmonella enterica*; III= *Entrococcus hirea*; IV= *Staphylococcus aureus*; V= *Pseudomonas aeroginosa*. Activity:± = inhibition but no clear halo; + = presence of a clear zone of growth inhibition around spots >1 mm; ++ = presence of a clearly defined inhibition zone between 2 and 5 mm surrounding the colony in the spot test; – = no inhibition.

۳-٤- زنده‌مانی سویه‌ها در شیره مشابه معده و روده

نمودار ۱ مقاومت سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از ماست لیقوان نسبت به شرایط دستگاه گوارش را نمایش می‌دهد. زنده‌مانی سویه‌ها در شرایط دستگاه گوارش بین ۵۸/۲٦ تا ۸۸/٤٥ ٪ متغیر است. بالاترین مقاومت به شرایط دستگاه گوارش مربوط به سویه Y3 و کمترین مقاومت از سویه Y9 به دست آمد. نتایج نشان داد سویه‌های جدا شده از ماست لیقوان مقاومت بالایی نسبت به شرایط دستگاه گوارش نشان دادند. همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است زنده‌مانی سویه‌های لاکتوباسیلوس در شرایط دستگاه گوارش متفاوت می‌باشد. باکتری های اسید لاکتیک بایستی در مقابل ۲/۵ لیتر شیره معده و ۱ لیتر نمک های صفراوی که روزانه در دستگاه گوارش ترشح می شود مقاومت نمایند [۱۹]. مقاومت به شرایط اسیدی توسط جدایه ها علاوه بر زنده مانی آنها در شرایط اسیدی دستگاه گوارش، کاربرد آنها به عنوان کشت آغازگر در محصولات لبنی میسر می سازد [۲۰]. هاشمی و همکاران در سال ۲۰۱٤ گزارش نمودند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* که از نمونه های پنیر کردی جداسازی شده بوده اند، نسبت به شرایط مشابه معده مقاوم هستند.

لاکتوباسیلوس کازئی و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* جداشده از پنیرهای سنتی کردی در طی ۱۲۰ دقیقه در شرایط pH ۲ مقاومت بالایی را نشان دادند [۲۱]. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* جدا شده از پنیر سفید ایرانی قابلیت زنده مانی در pH ۳ به مدت ۳ ساعت را نشان دادند [۲۲]. تاج آبادی ابراهیمی و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش نمودند که جدایه های لاکتوباسیلوس از نمونه های پنیر سنتی قادر است شرایط معده را تحمل نمایند و به طور موثری عمل نمایند. در این تحقیق *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس جنسنی* بالاترین مقاومت را به شرایط مشابه معده نشان دادند.

در مطالعه دیگری میرزایی و همکاران نشان دادن که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از پنیر لیقوان قادر به زنده مانی بعد از ۲ ساعت گرمخانه گذاری در pH ۱/۵۵ هستند و تعداد نهایی سلول ها ۶/۳ و Log cfu/g ۷/۸۶ گزارش گردید.

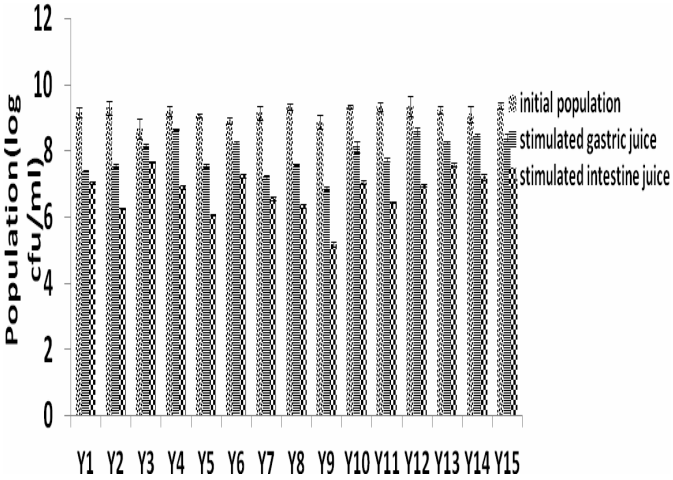

Fig 1 Effect of simulated gastric juice on the selected isolates of LAB from Lighvan yoghurt

۳-۵- غیر مزدوج کردن نمک های صفراوی

نتایج ویژگی های پروبیوتیکی جدایه های لاکتوباسیلوس در حضور GDC،GC،TDC،TC در جدول ٤ آمده است. نتایج نشان داد ٤ جدایه GC، ۷ جدایه GDC، ۸ جدایه TC و ۸ جدایه TDC را رسوب دادند و یا به عبارت دیگر آنزیم لازم برای آبکافت نمک های صفراوی تولید نمودند.

غیر مزدوج نمودن نمک های صفراوی یک ویژگی مهم جدایه های لاکتوباسیلوس می باشد، که آن ها را قادر به کاهش کلسترول سرم، حفظ تعادل دستگاه گوارش و تولید و گسترش پروتئین های سورفکتانت می نماید. این عوامل سبب مقاومت لاکتوباسیلوس ها در مقابل نمک های صفراوی می شوند [۱۰].

در حالیکه آزمایش اولیه در مورد مقاومت به نمک های صفراوی جدایه های لاکتوباسیلوس جدا شده از ماست لیقوان نشان داد که بسیاری از جدایه ها نسبت به نمک های صفراوی حساس هستند. جدایه های منتخب مقاومت خوبی را نسبت به تمام نمک های صفراوی نشان دادند. نتایج جدول ٦ نشان می دهد که جدایه هایی که قادر به رشد در حضور نمک های صفراوی مزدوج هستند با این وجود قادر به غیر مزدوج کردن آن ها نیستند. این ویژگی ثابت می کند که ظرفیت آبکافت نمک های صفراوی ایزوله ها با ظرفیت تحمل سمیت نمک های صفراوی مزدوج ارتباطی ندارد [۲۵].

جیلیلند در سال ۱۹۷۹ گزارش کرد که لاکتوباسیلوس های جداسازی شده از روده حیوانات نسبت به جدایه های شیر مقاومت بیشتری به نمک های صفراوی دارند [۲٦]. براشیر و همکاران که در سال ۱۹۹۸ بر روی جدایه *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* انجام شد نشان داد که این جدایه ها قادر به غیر مزدوج کردن Sodium-TC می باشند [۲۷].

۳-٦- فعالیت β-گالاکتوزیداز

β -گالاکتوزیداز یک آنزیم مفید است که قادر به تجزیه لاکتوز به گالاکتوز و گلوکز می باشد [۲۸]. فعالیت این آنزیم می تواند به خاطر حضور سیستم گلوکز فسفوترانسفراز در جدایه باشد. از طرف دیگر به دلیل فقدان آنزیم *β -گالاکتوزیداز* درناحیه بالای روده کوچک افراد عدم تحمل لاکتوز حضور این آنزیم در جدایه ها باعث کمک به هضم و جذب لاکتوز در این افراد می شود [۲۹].

باکتری های پروبیوتیک لاکتوز را مصرف کرده و آن را تبدیل SCFA[1] می کنندکه ماده ای مفید برای میزبان است [۳۰]. جدول ٤ نشان داد که جدایه های لاکتوباسیلوس ماست لیقوان قادر به تولید آنزیم β -گالاکتوزیداز می باشند . با این سویه های Y15 Y11, Y10, Y6, Y5 ,Y1 رنگ زرد شدیدی را نشان داد که نشان دهنده فعالیت بتا *-گالاکتوزیداز* بالایی است. نتیجه مشابهی از تجزیه لاکتوز توسط *ل. پلانتاروم* جدا شده از پنیر چیاپاس[2] توسط Zago و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش شد.

بتا *-گالاکتوزیداز* یک آنزیم درون سلولی است که در اثر عبور لاکتوباسیلوس از روده کوچک ترشح شده است [۳۱]. در این تحقیق جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PJ7 و *لاکتوباسیلوس نلوتیکوس* PJ4 فعالیت بتا-گالاکتوزیداز بالایی را

1. Short Chain Fatty Acids
2. Chiapas

نشان دادند. نتایج نشان داد جدایه های ماست لیقوان قابلیت تولید آنزیم β–*گالاکتوزیداز* را دارند.

۳-۷- آبگریزی سطح سلولی

یکی از راه های تشخیص برای تعیین لانه گزینی باکتری ها در سلول های اپیتلیال روده ماهیت آبگریزی ریزاندامگان ها است. آبگریزی سطح سلولی مناسب برای جدایه های لاکتوباسیلوس امکان چسبیدن آن ها به سلول های اپیتلیال روده و پروتئین های لایه خارجی و تشکیل کلنی را افزایش داده و باعث حفظ و نگهداری آن ها در دستگاه گوارش میزبان می شود [۱۰]. جدول ٤نشان می دهد که جدایه Y6 با ٦٢/٤٥ ٪ بالاترین درصد آبگریزی سطح سلولی را دارا می باشند. و این در حالی است که کمترین خاصیت آبگریزی سطح سلولی را Y3 با ۱۲/۱۵ ٪ دارا می باشد ($p< ۰/۰۵$).

کولوکا و همکاران در سال ۲۰۰۰ از لحاظ آبگریز سطح سلولی لاکتوباسیلوس ها در سه گروه قابل تقسیم بندی است که این سه گروه شامل آبگریزی کم(۰–۳۵٪)، آبگریزی متوسط(۳٦–۷۰ ٪) و آبگریزی زیاد (۷۱–۱۰۰ ٪) طبقه بندی کرد [۱۰].

تعیین آبگریزی سطح سلولی به طور گسترده ای برای تعیین خاصیت آبگریزی سطح سلول های لاکتوباسیلوس انجام گرفته است[۳].

حضور ملکول های آبگریزی از گلیکوپروتئین ها و لیپید های سطح سلولی را نمایانگر آبگریزی سطح سلولی است و حضور پلی ساکارید نشان دهنده آبدوست سطح سلول می باشد [۳۲]. از طرف دیگر مشاهده شد که سلول های با آبگریزی بالا برهمکنش بهتری با سلول های اپیتلیال روده دارند [۳۳].

لاکتوباسیلوس کازئی و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* جدا شده از پنیر سنتی کردی درجه مختلفی از آبگریز را نشان دادند [۳٤].

۳-۸- توانایی تولید پراکسید هیدروژن

مقدار پراکسید هیدروژن تولید شده توسط جدایه های لاکتوباسیلوس تحقیق حاضر در جدول ٤ آورده شد. به جز جدایه های Y4 و Y15بقیه جدایه ها قادر به تولید پراکسید هیدروژن ($p< ۰/۰۵$) بودند. مقدار پراکسید تولید شده توسط جدایه ها بین μg/ml ۷/۱۲–۰/۰۰ متغیر بود. نتایج مشابهی در جدایه های با منشاء لبنی و انسانی گزارش گردید. استفاده از لاکتوباسیلوس های با توانایی تولید پراکسید هیدروژن در رژیم غذایی از تکثیر و تجمع ریزاندامگان بیماری زا و سرمادوست که قادر به زنده ماندن در یخچال هستند، در روده جلوگیری می کنند[۱۰].

ریزاندامگان روده ای از قبیل سالمونلا، اشرشیاکلی O157:H7، لیستریا، *انتریتیدیس مونوسایتوژنز* توسط جدایه های لاکتوباسیلوس دارای توانایی تولید پراکسید هیدروژن به شدت از بین می روند[۳]

فعالیت ضد میکروبی پراکسید هیدروژن به ویژگی اکسیداتیو آن مربوط است که باعث اکسید شدن دیواره سلولی و همچنین شکستن پیوند در ساختمان پروتئین می شود[۳۵]. در شیر خام پراکسید هیدروژن توسط باکتری های اسید لاکتیک تولید می شود که بعدا توسط لاکتوپراکسیداز آبکافت شده و تیوسیونات درون زاد را اکسید می کند. پراکسید هیدروژن تولید شده توسط پروبیوتیک ها از عفونت ادراری و تناسلی جلوگیری می نماید [۲۱].

در طی تخمیر محصول ماست H_2O_2 تولید می شود. *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه *بولگاریکوس* در طی تخمیر قادر به تولید پراکسید هیدروژن می باشد که توسط $NADH:H_2O_2$ اکسیداز تولید می شود و در ادامه تخمیر *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* توسط NADH پراکسیداز، H_2O_2 را تجزیه می نماید. چنانچه سازوکار بازدارنده در دسترس سلول نباشد تجمع پراکسید هیدروژن و سایر ترکیبات سمی از قبیل آنیون های سوپر اکسید و رادیکال هیدروکسیل زنده مانی پروبیوتیک را کاهش می دهد. pH بهینه فعالیت آنزیم NADH پراکسیداز pH=5 است که با کاهش pH ماست طی نگهداری فعالیت آن کاهش می یابد. چنانچه جدایه های لاکتوباسیلوس تحقیق قادر به تولید آنزیم کاتالاز باشد آب اکسیژنه به اکسیژن و آب آبکافت می شود [۳٦].

Table 4 Bile salts deconjugation, β-galactosidase activities and hydrogen peroxide production of fifteen LAB isolated from Lighvan yoghurt samples

Strain	Deconjugation of bile salts [a,b]				β-galactosidase activity [c]	CHS (%) [d]	H_2O_2 production (μg/mL) [d]
	GC	GDC	TC	TDC			
Y1	-	+	g	+	YY	34.25±1.19[c]	2.13±0.09[d]
Y2	g	+	g	+	Y	18.41±0.67 [d]	6.65±0.34[b]
Y3	g	-	+	+	Y	12.15±0.13 [e]	3.12±0.22[cd]
Y4	+	+	g	wg	Y	41.53±2.14 [b]	000±0.00[a]
Y5	-	-	+	g	YY	12.38±0.91 [e]	5.12±0.18[bc]
Y6	-	-	g	g	YY	62.45±1.29 [a]	7.42±0.36[a]
Y7	+	+	+	+	Y	46.25±2.85 [b]	8.16±0.54[a]
Y8	g	g	++	+	Y	17.21±0.39 [d]	3.12±0.18[cd]
Y9	+	+	-	+	Y	19.74±1.25 [d]	1.45±0.37[e]
Y10	+	++	+	+	YY	36.24±1.32 [c]	1.36±0.21[e]
Y11	g	g	g	g	YY	19.25±0.48 [d]	3.49±0.51[c]
Y12	g	g	+	-	Y	13.21±0.69 [de]	4.51±0.56[c]
Y13	g	+	+	+	Y	41.67±1.37 [b]	3.14±0.17[cd]
Y14	g	g	g	-	Y	15.81±0.77 [d]	2.76±0.41[d]
Y15	-	-	+	g	YY	31.82±1.54[c]	0.00±0.00[f]

[a] GC = sodium glycocholate, GDC = sodium glicodeoxycholate, TC = sodium taurocholate, TDC = sodium taurodeoxycholate.
[b] - = no growth; wg = weak growth; g = growth; + = growth and bile salt deconjugation; ++ = growth and strong bile salt deconjugation.
[c] YY = strong yellow color; Y = yellow color; NC = no color change
[d] Values in the same columns followed by different letters (a-e) are significantly different ($p < 0.05$).) according to Duncan's multiple range test.

٤- نتیجه گیری

در این تحقیق آزمون‌های *in vitro* از قبیل مقاومت به نمک‌های صفراوی و شرایط دستگاه گوارش، قابلیت تحمل آنتی‌بیوتیک و فعالیت ضد میکروبی سویه‌های جدا شده از ۵ نمونه ماست لیقوان مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۱۵ سویه توانایی پروبیوتیکی بالاتری داشتند. البته آزمون‌های *in vivo* و *in vitro* بیشتر از قبیل اثر سویه‌ها بر کلسترول و قند خون موش‌های آزمایشگاهی، چسبیدن به سلول‌های اپیتلیال روده، توانایی تولید باکتریوسین، پر اکسید هیدروژن و آنزیم‌های آبکافت کننده نمک‌های صفراوی برای شناخت سایر ویژگی‌های پروبیوتیک سویه‌های حاضر باید صورت پذیرد تا بتوانیم از این سویه‌ها در تولید فراورده‌های پروبیوتیک سلامت بخش استفاده نماییم.

۵- سپاسگذاری

از همکاری بی دریغ بخش میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج در مسیر انجام این تحقیق قدردانی و تشکر می گردد. همچنین از آقای دکتر محمد امین حجازی که در تهیه نمونه ها از روستای لیقوان استان آذربایجان شرقی همکاری نمودند تشکر می نماید.

٦- منابع

[1] Garsa, A. K., Kumariya, R., Kumar, A., Lather, P., Kapila, S., Sood, S. K., and Kapasiya, M. (2014). *In vitro* evaluation of the probiotic attributes of two pediococci strains producing pediocin PA-1 with selective potency as compared to nisin. *European Food Research and Technology*. 239:491–499.

[2] Vinderola, C. G., and Reinheimer, J.A. (2003) Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative ''*in vitro*'' study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*. 36:895–904.

[3]. Tavakoli M., Hamidi-Esfahani Z., Hejazi M. A., Azizi M. H., and Abbasi S. (2016). Isolation and identification of probiotics from Mazandaran local cheese and studying the effect of prebiotics on survival of probiotics in symbiotic yoghurt during refrigerated storage.

Ph.D dissertation, Tarbiat Modare University, Tehran, Iran.

[4] Pennacchia C, Ercolini D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G., and Villani, F. (2004). Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science*, 67: 309–317.

[5] Kumar, A., Kumar, D. (2014). Isolation and characterization of bacteria from dairy samples of Solan in Himachal Pradesh for identification of Lactobacillus spp. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 25:110–114.

[6] Leite A. M. O., Miguel M. A. L., Peixoto R. S., Ruas-Madiedo P, Paschoalin V. M. F., and Mayo B. (2015). Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 98: 3622–3632.

[7] Guo Z, Wang J, Yan L, Chen W, Liu X. M, and Zhang H. P. (2009). *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT - Food Science and Technology*, 42:1640–1646.

[8] dos Santos K. M. O., Vieira A. D. S., Buriti F. C. A. , do Nascimento J. C. F., de Melo M. E. S., Bruno L. M. (2015). Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Dairy Science and Technology*, 95: 209–230.

[9] Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letter*. 9: 29–33.

[10] Tavakoli M, Hamidi-Esfahai Z, Hejazi M. A., Azizi M. H., and Abbasi S. (2017). Characterization of probiotic abilities of lactobacilli isolated from iranian koozeh traditional cheese. *Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences*, 67(1), 41–48.

[11] Tavakoli M, Hamidi-Esfahai Z, Hejazi M. A., Azizi M. H., and Abbasi S. Probiotic potential of lactobacillus strains isolated from mazandaran local cheese. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*. 2016; 11 (4) :89–98.

[12] Arici, M., Bilgin B., Sagdic, O., and Ozdemir, C. (2004). Some characteristics of Lactobacillus isolates from infant faeces. *Food Microbiology*. 21:19–24.

[13] Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., and Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, 57: 176–195.

[14] Sharma P., Tomar S. K., Sangwan V., Goswamı P., and Singh R. (2016). Antibiotic resistance of *Lactobacillus* sp. ısolated from commercial probiotic preparations. *Journal of Food Safety*, 36(1), 38–51.

[15] Casado Munoz M. D. C., Benomar N., Lerma, L. L., Galvez A., and Abriouel H. (2014). Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Alorena table olives throughout fermentation process. *International Journal of Food Microbiology*. 172: 110–118.

[16] Pesavento G., Calonico C., Ducci, B., Magnanini A., and Lo Nostro A., (2014). Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus spp*. isolated from retail cheese, ready to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiology*. 41: 1–7.

[17] Jaouani I., Abbassi, M. S., Ribeiro S. C., Khemiri M., Mansouri R., Messadi L., and Silva, C. C. G., (2015). Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolates from Tunisia. *Journal of Applied Microbiology*. 119: 1089–1100.

[18] Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., and Franz, C. M. A. P. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 730–739.

[19] Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiology*, 33: 282–291.

[20] Wang, C. Y., Lin, P. R., Ng, C. C., & Shyu, Y. T. (2010). Probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, 16, 578–585**.**

[21] Šušković, J., Blaženka, K., Beganović, J.,Pavunc, A. L.,Habjanič, K., and Matošić, S. (2010). Antimicrobial activity—the most

[29] Hussain, M., Khan, M. T., Wajid, A., and Rasool, S. A. (2008). Technological characterization of indigenous enterococcal population for probiotic potential, *Pakistan Journal of Botany,* 40 –75.

[30] Naidu, A. S, Bidlack, W. R., and Clemens, R. A. (1999) Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.38 (1): 13–126.

[31] Montanari G., Zambonelli C., Grazia L., Benevelli M., and Chiavari C. (2000) Release obetagalactosidase from lactobacilli. *Food Technology and Biotechnology*. 38: 129–33.

[32] Osmanagaoglu, O., Kiran F., and Ataoglu H. (2010). Evaluation of *in vitro* probiotic potential of Pediococcus pentosaceus OZF isolated from human breast milk, *Probiotics and Antimicrobial Proteins,* 2: 162–174.

[33] Gusils C., Gonz alez S. N., and Oliver G. (1999).Some probiotic properties of chicken lactobacilli, *Canadian Journal of Microbiology,*45: 981–987

[34] Tofangsazan, F. (2014). Probiotic activity of *Lactobacillus* strains isolated from traditional Kurdish cheese. Dissertation, University of Ferdowsi of Mashhad.

[35] Lindgren, S. E., and Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Review*. 87: 149–164.

[36] Ng, E. W., Yeung, M., Tong, P. S. (2011). Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. *International Journal of Food Microbiology*. 145: 169–175.

important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*. 48: 296–307.

[22] Hashemi, S. M. B., Shahidi, F., Mortazavi, S. A., Milani, E., and Eshaghi, Z. (2014). Potentially probiotic *Lactobacillus* strains from traditional Kurdish cheese. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 6: 22–31.

[23] Tajabadi Ebrahimi, M., Ouwehand, A. C., Hejazi, M. A., and Jafari, P. (2011). Traditional Iranian dairy products: a source of potential probiotic lactobacilli. *Africian Journal of Microbiology Research.* 5: 20–27.

[24] Mirzaei, H., and Barzgari, A., (2012). Isolation and molecular study of potentially probiotic Lactobacilli in traditional white cheese of Tabriz in Iran. *Annals of Biological Research*. 3: 2019–2022.

[25] Moser S. A., and Savage D. C. (2001) Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology* , 67: 3476–3480.

[26] Gilliland, S. E. (1979). Beneficial interrelationships between certain microorganisms and human: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *Journal of Food Protection*. 42: 164–167.

[27] Brashears M. M., Gilliland S. E., and Buck L. M. (1998). Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei. Journal of Dairy Science*. 81: 2103–2110.

[28] Harrington L., and Mayberry J. (2008). A re-appraisal of lactose intolerance, *International Journal of Clinical Practice,* 62 :1541–1546.

Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from Lighvan yoghurt

Tavakoli, M. [1*]

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

(Received: 2016/12/23 Accepted:2017/02/07)

This study investigates probiotic capability of Lactobacillus strains got from 5 samples of yogurt were gathered from provincial territory of Lighvan. Totally 100 strains were identified as Lactobacillus by phonotypical and biochemical testes. Then probiotic potential properties including ability to survive in reenacted gastrointestinal condition, resistance to bile salts, hindrance of pathogenic bacteria, and susceptibility of antibiotic discs were done. 34 strains survived in acidic and bile condition. Among these 34 strains, 15 Lactobacillus strains including Y1 to Y15 showed good probiotic potential. Y1, Y5 and Y13 were resistant to all the used bile concentrations. All strains had strong resistance to vancomycin, streptomycin and gentamicin antibiotic disks. Y12 strain prevent the growth of all foodborne pathogens.Y3 strain showed highest (88.45%) and Y9 strain showed lowest viability (58.26%) in simulated gastrointestinal condition. All the strains demonstrated low sensitivity to the presence of conjugated bile salts. Y1, Y5, Y6, Y10, Y11 and Y15 strains exhibited the most elevated enzymatic activity of β-galactosidase. Y7 strain generated the highest amount ($P<0.05$) of hydrogen peroxide followed by Y6 and Y2 strains. The most chose LAB isolated had a Low cell surface hydrophobicity, Y6 communicated the most astounding surface hydrophobicity ($P<0.05$). Strains isolated from Lighvan yoghurt indicated good probiotic properties, yet assist in vitro and in vivo considers on these strains are still required.

Keywords: Probiotic properties, Lactobacillus, Lighvan yoghurt

* Corresponding Author E-Mail Address: mtavakkoli.z@gmail.com