



## مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: [www.fsct.modares.ac.ir](http://www.fsct.modares.ac.ir)

مقاله علمی-پژوهشی

### ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس برویس به عنوان باکتری اسید لاکتیک غالب جدا شده از آمارانت تخمیر شده

پروین شایسته‌کیا<sup>۱</sup>، علیرضا صادقی<sup>۲\*</sup>، مهدی کاشانی‌نژاد<sup>۳</sup>، مرتضی خمیری<sup>۴</sup>، مریم زارعلی<sup>۵</sup>

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۳- استاد گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۴- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۵- دانشجوی دکتری زیست فناوری مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

#### اطلاعات مقاله

#### چکیده

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از شبه غلات تخمیر شده در تهیه کشت‌های میکروبی اهمیت وافری دارد. در پژوهش حاضر، پس از شناسایی مولکولی، خصوصیات پروبیوتیکی باکتری اسید لاکتیک غالب جدا شده از تخمیر آمارانت مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی‌یابی محصولات PCR منجر به شناسایی لاکتوباسیلوس برویس به عنوان جدایه لاکتیکی غالب گردید. زنده‌مانی جدایه مذکور پس از تیمار متوالی اسید و صفرا در مقایسه با نمونه کنترل از  $10^8$  به حدود  $10^6$  CFU/mL رسید و بیشترین اثر ضد باکتریایی را در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان داد. با این حال، هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در حضور جدایه لاکتیکی در مقایسه با هاله عدم رشد لیستریا مونوسییتوزنز اختلاف معنی‌داری نداشت ( $P > 0/05$ ). همچنین جدایه لاکتیکی قابلیت خود انصالی (۳۶/۱۹ درصد) و دگر انصالی مناسبی با *استافیلوکوکوس اورئوس* (۷۱/۲۴ درصد) داشت و فاقد فعالیت همولیزی بود. علاوه بر این، نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه مقاوم بود. با توجه با قابلیت‌های پروبیوتیکی مناسب لاکتوباسیلوس برویس جدا شده از تخمیر آمارانت می‌توان از آن به عنوان کشت میکروبی آغازگر و یا پروبیوتیک در صنایع تخمیری استفاده نمود.

تاریخ‌های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۴

کلمات کلیدی:

جدایه لاکتیکی غالب،  
آمارانت تخمیر شده،  
خصوصیات پروبیوتیکی.

DOI: 10.22034/FSCT.19.132.65

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.132.5.8

\* مسئول مکاتبات:

Sadeghi.gau@gmail.com

## ۱- مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی به مقدار کافی مصرف می‌شوند، فواید سلامتی‌بخشی در مصرف‌کننده به همراه دارند [۱]. خمیرترش مخلوطی از آب و آرد است که به صورت تصادفی یا با استفاده از کشت آغازگر شامل باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها تخمیر می‌شود و دارای قابلیت‌های فناوری-عملکردی جالب توجهی می‌باشد. باکتری‌های اسید لاکتیک شامل گروهی ناهمگن از ارگانیسم‌های گرم مثبت، غیر اسپورزا، غیر متحرک، هوازی، میله‌ای و یا کوکسی شکل هستند که اسید لاکتیک را به عنوان محصول اصلی و نهایی در طی تخمیر کربوهیدرات‌ها تولید می‌کنند. باکتری‌های اسید لاکتیک با منشا متفاوت و دارای فعالیت‌های زیستی بالقوه نیز وجود دارند که در بین آن‌ها گونه‌های لاکتوباسیلوس، رایج‌ترین جنس می‌باشند [۲].

آمارانت (*Amaranthus*) متعلق به خانواده *Amaranthaceae* یک تیره جهانی از گیاهان چند ساله با عمر کوتاه است که تقریباً ۶۰ گونه دارد و منشاء آن کشور مکزیک می‌باشد. این شبه غله دارای لیپیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و فیبرهای رژیمی در سطح بسیار بالایی است. همچنین ترکیبات مهمی مانند توکوفرول‌ها و ترکیبات فنولی نیز در آمارانت وجود دارند و اسیدهای چرب اصلی در روغن آمارانت شامل پالمیتیک، اولئیک و لینولئیک می‌باشد. همچنین آمارانت دارای سطح بالایی از اسیدهای آمینه ضروری مانند لایزین و متیونین، ویتامین‌ها و مواد معدنی به ویژه کلسیم و منیزیم است [۳].

تاکنون مطالعاتی در خصوص فلور میکروبی آمارانت تخمیر شده صورت گرفته است. به عنوان مثال، Sterr و همکاران (۲۰۰۹) از تخمیر تصادفی خمیرترش آمارانت، باکتری‌های اسید لاکتیک غالب را جداسازی نمودند. براین اساس، جدایه‌های لاکتوباسیلوس پلانتروم و پدیوکوکوس پنتازاسئوس با قابلیت رقابت‌پذیری مناسب، ضمن کاهش سریع pH امکان تخمیر ثابت و یکنواختی را در دماهای مختلف فراهم آورده، لذا به عنوان کشت آغازگر خمیرترش آمارانت برگزیده شدند [۴]. در پژوهشی Vera-Pingitore و همکاران (۲۰۱۶) باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از کینوا و آمارانت را از نظر حساسیت به

آنتی‌بیوتیک، تحمل شرایط نامساعد دستگاه گوارش و چسبندگی به سلول‌های اپیتلیال روده مورد بررسی قرار داده و از ۵ گونه که دارای الگوی مناسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی بودند، به عنوان پروبیوتیک استفاده نمودند [۵]. Russo و همکاران (۲۰۱۷) فعالیت ضد میکروبی ۸۸ زیرگونه لاکتوباسیلوس پلانتروم غربال شده را بررسی کرده و به این نتیجه رسیدند که غلظت بالای اسید لاکتیک تولید شده در طی فاز رشد باکتری‌های اسید لاکتیک با کاهش pH به نحو چشم‌گیری بر ویژگی‌های ضد میکروبی آن‌ها موثر است [۶].

تاکنون ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک غالب جدا شده از شبه غلات تخمیر شده کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. لذا هدف از این مطالعه، ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیک باکتری اسید لاکتیک غالب خمیرترش آمارانت بود.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد اولیه

جهت تهیه آرد آمارانت، یک واریته مشخص آمارانت (*Amaranthus Cruentus*) از شرکت کیان فود (ایران) خریداری شده و توسط دستگاه آسیاب صنعتی، آرد و با ال‌ک دارای مش ۵۰ آماده شد. ویژگی‌های آرد مذکور بر اساس روش‌های مدون (AACC, 2010) تعیین شدند [۷]. سویه‌های میکروبی مورد استفاده شامل *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli* PTCC 1399)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus* PTCC 1112)، *لیستریا مونوسیژنوز* (*Listeria monocytogenes* PTCC 1298) و *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus* PTCC 1015) نیز از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران، خریداری و سپس در محیط‌های کشت مناسب، فعال‌سازی شد. محیط‌های کشت میکروبی از شرکت مرک آلمان تهیه گردید.

### ۲-۲- تخمیر تصادفی آرد آمارانت

در این مرحله از آرد آمارانت با بازده خمیر معادل ۲۰۰ (مخلوط ۱۰۰ گرم آرد آمارانت با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب)، خمیرترش تهیه گردید. سپس خمیر مذکور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت

Basic local alignment search tool (Blast) با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی (NCBI) National center for biotechnology information هم‌ردیف شدند.

## ۲-۵- بررسی مقاومت جدایه لاکتیکی به اسید و صفرا

برای این منظور، جمعیت جدایه لاکتیکی به  $10^8$  CFU/mL تنظیم شد. سپس با استفاده از اسید کلریدریک ۱ نرمال، pH محیط کشت حاوی این باکتری به حدود ۲ رسانده شد. در مرحله بعد، سوسپانسیون باکتریایی مذکور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱/۵ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. در ادامه با استفاده از هیدروکسید سدیم ۱ نرمال، pH سوسپانسیون مذکور به حدود ۶ رسانده شد و در مجاورت نمک صفراوی با غلظت ۰/۳ درصد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱/۵ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از تیمار متوالی اسید و صفرا، رقت‌های متوالی از سوسپانسیون نهایی در رینگر استریل، تهیه و بر روی محیط کشت MRS agar کشت سطحی داده شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. در نهایت باکتری‌های زنده در مقایسه با نمونه شاهد (بدون تیمار اسید و صفرا) شمارش شدند [۱۰].

## ۲-۶- قابلیت خود اتصالی و دگر اتصالی جدایه لاکتیکی

برای ارزیابی خاصیت خود اتصالی، سلول‌های حاصل از کشت ۲۴ ساعته جدایه لاکتیکی توسط سانتریفوژ یخچال‌دار (هانیل کومبای، کره جنوبی) جدا و طی دو مرحله با بافر فسفات شستشو داده شدند. سپس ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی با جمعیت  $10^8$  CFU/mL در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. در ادامه، جذب نوری این سوسپانسیون در طول موج ۶۰۰ نانومتر و در زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت خوانده شد. در انتها میزان قابلیت خود اتصالی جدایه لاکتیکی بر اساس رابطه ذیل محاسبه گردید. در این رابطه  $A_0$  مقدار جذب در زمان صفر و  $A_t$  مقدار جذب بعد از ۲۴ ساعت می‌باشد [۱۰].

$$[1 - (A_t/A_0)] \times 100 = \text{میزان خود اتصالی}$$

برای ارزیابی خاصیت دگر اتصالی جدایه لاکتیکی با باکتری‌های

۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. برای جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیکی غالب، فرآیند مایه‌گیری (افزودن ۱۰ درصد خمیرترش روز قبل به خمیر تازه) تا رسیدن pH خمیرترش به حدود ۴ ادامه یافت [۸].

## ۲-۳- جداسازی باکتری اسید لاکتیکی غالب از خمیرترش آمارانت

برای رسیدن به تک پرگنه خالص جدایه‌های لاکتیکی غالب نیز پس از تهیه کشت سطحی از رقت‌های متوالی خمیرترش در محیط کشت De Man, Rogosa and (MRS) agar Sharpe و مطالعه مورفولوژی میکروسکوپی جدایه‌های لاکتیکی، نهایتاً از آن‌ها کشت خطی تهیه گردیده و آزمون‌های گرم و کاتالاز بر روی جدایه‌ها انجام شد.

## ۲-۴- شناسایی مولکولی باکتری اسید لاکتیکی غالب

DNA باکتری اسید لاکتیکی غالب با استفاده از کیت تجاری (بیونیر، AccuPrep K-3032، کره جنوبی) استخراج گردید و توسط PCR دارای پرایمرهای F44 و R1543، تکثیر و سپس محصولات PCR، توالی‌یابی (شرکت بیونیر، کره جنوبی) شدند. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنش‌گرهای آماده مصرف PCR (آمپلیکون، دانمارک)، ۱/۵ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۰/۵ پیکومولار، ۲ میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰۰ نانوگرم و ۵ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. در مرحله اول تکثیر، واسرشت DNA با شروع داغ در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، آغاز گشته و طی ۳۵ چرخه با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه ادامه یافت. در انتها، مرحله تکثیر انتهایی نیز به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (ترموسایکلر کوربت، مدل CG1-96، استرالیا) پایان یافت [۹]. به منظور تایید اولیه تکثیر، از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر Tris base, boric acid, EDTA (TBE) با ولتاژ ۹۰ به مدت ۴۰ دقیقه استفاده شد. در ادامه، به منظور شناسایی جدایه لاکتیکی، محصولات PCR پس از توالی‌یابی با استفاده از رویه

بیماری‌زا (استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیژنوز، اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس)، سلول‌های حاصل از کشت ۲۴ ساعته جدایه لاکتیکی توسط سانتیفریژ یخچال‌دار، جدا شده و دو بار توسط بافر فسفات شسته شدند. سپس مخلوطی از حجم‌های مساوی سوسپانسیون هر یک از باکتری‌های بیماری‌زا و سوسپانسیون جدایه لاکتیکی تهیه شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. در ادامه، جذب نوری مخلوط سوسپانسیون‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و از طریق معادله ذیل، میزان خاصیت دگر اتصالی محاسبه گردید. در این رابطه  $A_{lac}$  جذب سوسپانسیون جدایه لاکتیکی،  $A_p$  جذب سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا و  $A_{mix}$  جذب مخلوط سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و باکتری بیماری‌زا می‌باشد [۱۱].

$$= [(A_p + A_{lac})/2 - (A_{mix}) / (A_p + A_{lac}) / 2] \times 100$$

## ۷-۲- اثر ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی

برای ارزیابی اثر ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیژنوز، اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس از روش کشت دو لایه استفاده شد. ابتدا جدایه لاکتیکی در محیط کشت MRS broth و باکتری‌های غذازاد نیز در محیط کشت Brain Heart (BHI) broth Infusion در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. جمعیت جدایه لاکتیکی به  $CFU/mL$   $10^8$  ارسانده شد. سپس ۵ میکرولیتر از کشت فعال جدایه لاکتیکی در مرکز پلیت حاوی محیط کشت MRS agar لکه‌گذاری و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. در ادامه، سوسپانسیون هر باکتری غذازاد با جمعیت  $CFU/mL$   $10^6$  با محیط کشت BHI agar بر روی جدایه لاکتیکی لکه‌گذاری شده به صورت کشت دو لایه ریخته شد. پس از انعقاد لایه دوم، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت، قطر هاله عدم رشد در اطراف جدایه لاکتیکی با استفاده از نرم افزار Image J (نسخه 1.42e) تعیین گردید [۱۱].

## ۸-۲- مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه لاکتیکی

برای ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از کشت

۲۴ ساعته جدایه لاکتیکی به ۴ میلی‌لیتر محیط کشت MRS agar یک درصد (نیمه جامد) اضافه شد. در ادامه، مخلوط مذکور بر روی سطح پلیت‌های حاوی MRS agar ۱/۵ درصد جامد ریخته شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک رایج، شامل ونکومایسین، سفتریاکسون، نوبیوسین، ایمپنم، نالیدیکسیک اسید، کلیندامایسین، سیپروفلاکساسین، استرپتومایسین، آمپی-سیلین، پنی‌سیلین، سفازولین، سفالوتین، کانامایسین و جتتامایسین بر روی سطح هر پلیت قرار گرفتند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها توسط نرم افزار Image J اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت مقاوم (قطر کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر)، حساس (قطر بیش از ۲۰ میلی‌متر) و حساسیت نسبی (قطر ۱۵ تا ۱۹ میلی‌متر) گزارش گردید [۱۲].

## ۹-۲- قابلیت همولیز خون توسط جدایه لاکتیکی

برای بررسی قابلیت همولیز خون، جدایه لاکتیکی بر روی سطح محیط کشت آگاردار حاوی ۵ درصد خون گوسفند، کشت داده شده و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس، ایجاد هاله و تغییر رنگ در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت [۱۰].

## ۱۰-۲- آنالیز آماری نتایج

تمامی آزمون‌های این پژوهش در ۳ تکرار انجام شده و به منظور تجزیه و تحلیل آماری از طرح پایه کاملاً تصادفی با آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. داده‌های به دست آمده نیز توسط نرم‌افزار آماری SPSS، نسخه ۲۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح  $P < 0.05$  انجام شد. همچنین از نرم افزار Microsoft office Excel 2013 برای ترسیم نمودارها استفاده گردید.

## ۳- نتایج و بحث

### ۱-۳- جداسازی و شناسایی باکتری اسید لاکتیک

#### غالب

بر اساس نتایج آزمون‌های مرجع، آرد آمارانت مورد استفاده در

مایه‌گیری در تخمیر تصادفی خمیرترش عمدتاً با لاکتوباسیلوس-های هموفرمنتاتیو مواجه می‌شویم ولی در ادامه، لاکتوباسیلوس-های هتروفرمنتاتیو غالب می‌شوند. سه عامل باعث افزایش رقابت‌پذیری و تطابق لاکتوباسیلوس‌ها با محیط ویژه خمیرترش می‌شوند. این عوامل شامل سازگار بودن آنها با متابولیسم کربوهیدرات‌ها به عنوان منابع اصلی انرژی در خمیر، تطابق نیازهای رشد لاکتوباسیلوس‌ها به دما و pH تخمیر، دارا بودن چندین مکانیسم پاسخ برای غلبه بر تنش‌های ایجاد شده (نظیر اسید تولیدی، شرایط اسمزی، اکسیداسیون و کاهش مواد غذایی) هستند. علاوه بر این، تولید ترکیبات ضد میکروبی از جمله اسید-های آلی (نظیر لاکتات و استات) و متابولیت‌های ضد میکروبی همچون باکتریوسین‌ها رقابت لاکتوباسیلوس‌ها را بهبود می‌بخشد و می‌تواند به ماندگاری پایدار آنها در خمیرترش کمک کند [۱۶].

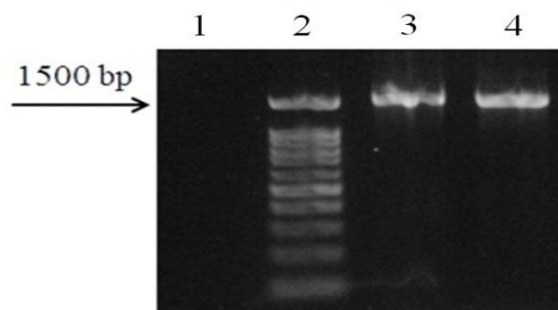
### ۲-۳- بررسی زنده‌مانی جدایه لاکتیکی در اسید و صفرا

زنده‌مانی جدایه لاکتیکی پس از تیمار متوالی اسید و صفرا در مقایسه با نمونه کنترل از  $10^8$  CFU/mL به حدود  $10^6$  CFU/mL رسید و دو سیکل لگاریتمی کاهش داشت.

فکری و همکاران (۲۰۲۰) زنده‌مانی *انتروکوکوس فاسیوم*، *پدیوکوکوس پتوزاسئوس* و *لوکونوستوک سیتروم* جدا شده از خمیرترش سنتی ایران را در pH معادل ۲ و نمک‌های صفراوی با غلظت ۰/۳ درصد به مدت ۳ ساعت مورد بررسی قرار دادند. *انتروکوکوس فاسیوم* AR-L02 بیشترین میزان مقاومت را در pH پایین (۹۵ درصد) و در حضور نمک‌های صفراوی (۷۹ درصد) نسبت به سویه‌های *پدیوکوکوس پتوزاسئوس* و *لوکونوستوک سیتروم* نشان داد [۱۷]. در طی پژوهش مشابهی زنده‌مانی *پدیوکوکوس پتوزاسئوس* PRK1، *لاکتوباسیلوس پلاتناروم* PRK7 و *لاکتوباسیلوس پلاتناروم* PRK11 جدا شده از حریره برنج تخمیری مورد بررسی قرار گرفت. این جدایه‌ها نسبت به  $pH = 2$  مقاوم بودند و زنده‌مانی آنها در صفرای ۰/۳ درصد به ترتیب ۸۸، ۸۷/۵ و ۸۱/۳ درصد بود [۱۸].

بر اساس پژوهش Adesulu-Dahunsi و همکاران (۲۰۱۸) ۵ جدایه لاکتیکی از غذاهای بر پایه غلات تخمیر شده نیجریه‌ای،

این پژوهش، دارای ۱۵/۶۹ درصد پروتئین، ۷/۱۷ درصد چربی، ۱۲/۳۹ درصد رطوبت، ۳/۳۰ درصد خاکستر و ۶۱/۴۵ درصد کربوهیدرات کل بود. پس از رسیدن pH خمیرترش آمارانت به حدود ۴، باکتری اسید لاکتیک غالب با روشی که قبلاً توضیح داده شد جدا گردید. بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و مورفولوژی، جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش آمارانت، یک باکتری گرم مثبت، کاتالاز منفی و میله‌ای شکل بود. ژل الکتروفورز محصولات PCR نیز منجر به تایید تکثیر اختصاصی توالی هدف ۱۵۰۰ جفت‌بازی در DNA ژنومی جدایه لاکتیکی گردید (شکل ۱). در نهایت بر اساس نتایج توالی‌یابی محصولات PCR و همردیفی آنها با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI جدایه لاکتیکی، *لاکتوباسیلوس برویس* SKA01 (۹۸ درصد تشابه) شناسایی شد.

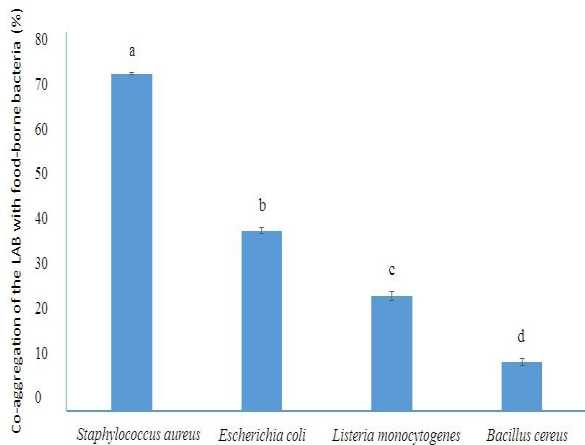


**Fig 1** Gel electrophoresis of the PCR products. Lane 1: negative control, lane 2: DNA ladder, lane 3: amplified DNA of the LAB isolate and lane 4: positive control.

در مطالعه Cakir و همکاران (۲۰۲۰) پس از بررسی فلور میکروبی جو پوست‌کنده تخمیر شده، *لاکتوباسیلوس برویس* به عنوان یکی از باکتری‌های غالب جدا شده از این بستر تخمیری معرفی گردید [۱۳]. محققین دیگری نیز *لاکتوباسیلوس برویس* 173 را از خمیرترش چاودار جدا نمودند [۱۴].

Ruiz Rodriguez و همکاران (۲۰۱۶) پس از تخمیر تصادفی آمارانت و فرآیند مایه‌گیری به مدت ۱۰ روز، گونه‌هایی از *لاکتوباسیلوس*، *پدیوکوکوس* و *انتروکوکوس* را از خمیرترش مذکور جداسازی نمودند [۸]. عوامل درونی سوبسترا (کربوهیدرات، منابع نیتروژن، مواد معدنی، لیپیدها و فعالیت آنزیمی) و مولفه‌های فرآیند (بازده خمیر، اکسیژن، زمان تخمیر، دمای تخمیر و تعداد فرآیند مایه‌گیری) به طور قابل توجهی بر فلور میکروبی خمیرترش تاثیر می‌گذارند [۱۵]. در شروع فرآیند

حضور پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش است و هر چه درصد خود اتصالی بیشتر باشد توانایی باکتری‌های پروبیوتیک برای اتصال به سلول‌های اپیتلیال بیشتر می‌شود. دگر اتصالی مانعی برای جلوگیری از لانه‌گزینی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در سطح روده محسوب می‌شود [۲۴، ۲۳].



**Fig 2** Co-aggregation percentage of the LAB isolate with food-borne bacteria. Different letters show significant difference at  $P < 0.05$ .

Vasiee و همکاران (۲۰۲۰) میزان خود اتصالی پدیوکوکوس پنتوزاسئوس DHR005 را ۲۸/۸ درصد و پدیوکوکوس اسیلی لاکتیسی LAH-5 را ۴۸ درصد اعلام کردند و این در حالی است که میزان خود اتصالی جدایه لاکتیکی در پژوهش مذکور بعد از گذشت ۲۴ ساعت به ۳۶/۱۹ درصد رسید [۲۵]. Han و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که از میان ۱۰ باکتری اسید لاکتیک مورد بررسی لاکتوباسیلوس برویس دارای بیشترین میزان خود اتصالی بود. بدین صورت که میزان خود اتصالی آن پس از ۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به حدود ۲ و پس از ۲۴ ساعت به ۸۰ درصد رسید [۲۶]. طبق پژوهش Zangeneh و همکاران (۲۰۱۹) قابلیت خود اتصالی و دگر اتصالی لاکتوباسیلوس پلانتاروم KHMZ در طول ۵ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق به طور قابل توجهی از لاکتوباسیلوس پلانتاروم MZRF بیشتر بود به طوری که این سویه بالاترین تجمع با استافیلوکوکوس اورئوس را از خود نشان داد [۲۷]. درصد دگر اتصالی عوامل بیماری‌زا و پروبیوتیک به سویه آنها و زمان گرمخانه‌گذاری وابسته است. توانایی

شامل لاکتوباسیلوس پلانتاروم YO175، لاکتوباسیلوس پلانتاروم OF101، پدیوکوکوس پنتوزاسئوس OF31، ویسلا کانفوسا OF126 و ویسلا کانفوسا WS90 زنده‌مانی خوبی را در  $pH = 2$  و  $pH = 3$  داشتند. همه جدایه‌ها (به جز ویسلا کانفوسا WS90) مقاومت خوبی را در برابر نمک‌های صغراوی ۰/۳ درصد به مدت ۴ ساعت از خود نشان دادند [۱۹]. طبق گزارش Sadeghi و همکاران (۲۰۱۹) از میان ۳ جدایه لاکتیکی خمیرترش سبوس برنج که قادر به زنده ماندن در  $pH$  معادل ۲ و شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش بودند، لاکتوباسیلوس برویس بیشترین زنده‌مانی را داشت [۲۰]. مهمترین عوامل موثر بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در دستگاه گوارش شامل قابلیت تحمل  $pH$  پایین و هیدرولیز نمک‌های صغراوی می‌باشد. مکانیسم‌های متداول برای مقاومت به اسید در باکتری‌های اسید لاکتیک، پمپاژ پروتون توسط فعالیت  $F_1-F_0$ -ATPase، سیستم گلوتامات دکربوکسیلاز، تشکیل ابر محافظ آمونیاک، فعالیت بالای اورده‌آزی، ترمیم یا محافظت از ماکرومولکول‌ها و تشکیل بیوفیلم و فرآیندهای خنثی‌سازی است [۲۱]. تحمل صغرا توسط پروبیوتیک‌ها نیز مربوط به فعالیت آنزیم هیدرولازی آنها است که به هیدرولیز شدن صغرای کنژوگه و کاهش اثر سمی آن کمک می‌کند [۲۲].

### ۳-۳- قابلیت خود اتصالی و دگر اتصالی جدایه لاکتیکی

میزان قابلیت خود اتصالی جدایه لاکتیکی در این مطالعه پس از ۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به حدود ۱ درصد و پس از ۲۴ ساعت به ۳۶/۱۹ درصد رسید. میزان قابلیت دگر اتصالی جدایه پس از گذشت ۲۴ ساعت با اشرشیا کلی ( $37/99 \pm 0/61$ )، استافیلوکوکوس اورئوس ( $71/24 \pm 0/23$ )، لیستریا مونوسیترنر ( $24/18 \pm 1/05$ ) و باسیلوس سرئوس ( $10/22 \pm 0/70$ ) درصد بود که به شکل معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) با یکدیگر اختلاف داشتند (شکل ۲). خود اتصالی و دگر اتصالی از ویژگی‌های مهم مرتبط با اثرات مفید پروبیوتیک‌ها محسوب می‌شوند که به ترتیب، به عنوان تجمع باکتری‌های هم‌نوع و تجمع باکتری‌های سویه‌های مختلف تعریف می‌شوند. خود اتصالی عامل ساکن شدن و لازمه تداوم

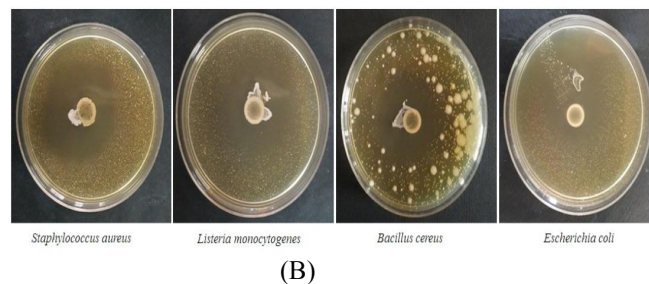
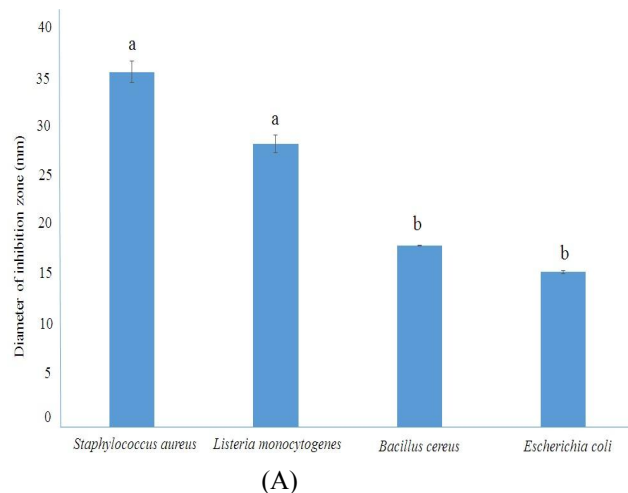
شده پوزا<sup>۱</sup> را در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی مطالعه کردند. این پژوهشگران، قطر هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس را ۲۱ میلی‌متر و اشرشیا کلی را ۱۸ میلی‌متر گزارش نمودند. در پژوهش حاضر، قطر هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس ۳۵ میلی‌متر و اشرشیا کلی ۱۵ میلی‌متر بود [۳۰]. نتایج دو بررسی حاکی از آن است که اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس برویس SKA01 در پژوهش حاضر در برابر استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر و در برابر اشرشیا کلی کمتر بود. در پژوهشی Ramos و همکاران (۲۰۱۳) با جداسازی ۵۱ باکتری اسید لاکتیک با قابلیت زنده‌مانی مناسب، اثر ضد باکتریایی آن‌ها را مورد بررسی قرار دادند که از بین این جدایه‌ها، ۲ نوع لاکتوباسیلوس برویس SAU105 و FFC199 و لاکتوباسیلوس فرمنتوم دارای اثر مهارکنندگی در برابر لیستریا مونوسیژنوز و استافیلوکوکوس اورئوس بودند [۳۱]. بر اساس مطالعه Tavakoli و همکاران (۲۰۱۷) همه جدایه‌ها به جز لاکتوباسیلوس پلانتاروم MT.ZH293 و لاکتوباسیلوس پتوسوس MT.ZH693، رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس ایروجینوزا را مهار کردند [۳۲].

پروبیوتیک‌ها با مکانیسم‌های متعددی مانند رقابت برای مواد مغذی، مهار چسبندگی عوامل بیماری‌زا به سلول‌های مخاطی، مهار تهاجم عوامل بیماری‌زا به سلول‌های اپیتلیال، تولید متابولیت‌های ضد میکروبی و یا تحریک مصونیت مخاطی از اثرات مضر عوامل بیماری‌زای روده جلوگیری می‌کنند [۳۳]. متابولیت‌های ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک شامل اسید‌های آلی (اسید لاکتیک، اسید استیک، اسید فرمیک، اسید پروپیونیک و اسید بوتیریک) که عمل آن‌ها با کاهش pH محیط تشدید می‌شود و همچنین متابولیت‌های دیگری مانند اتانول، اسیدهای چرب، پراکسید هیدروژن، دی استیل، ترکیبات با وزن مولکولی پایین نظیر باکتریوسین‌ها (نایسین، رتوترین، رتوتری سایکلین، پدیوسین، لاکتیسین و انتروسین) و ترکیبات مهارکننده شبه باکتریوسینی می‌باشد [۳۴]. باکتریوسین‌ها معمولا رشد باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت را مهار می‌کنند و علت اصلی مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی وجود هیدروکسی

باکتری‌های اسید لاکتیک متداول جدا شده برای دگر اتصالی با عوامل بیماری‌زا ممکن است به اجزای سلولی آنها نسبت داده شود. احتمالا فعل و انفعالات بین کربوهیدرات-لکتین و اجزای پروتئینی موجود در سطح سلول در این پدیده موثر هستند [۲۹،۲۸].

### ۳-۴- اثرات ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی

همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است اثر بازدارندگی جدایه لاکتیکی بر استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیژنوز نسبت به اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس به شکل معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بیشتر بود اما بین اثر ضد باکتریایی این جدایه بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیژنوز، اختلاف معنی‌داری ( $P > 0.05$ ) مشاهده نشد.



**Fig 3** Diameter of inhibition zone of the food-borne bacteria in the present of the LAB isolate in antibacterial assay. The different letters show significant difference at  $P < 0.05$  (A), and co-culture of the LAB and each food-borne bacterium (B).

Somashekaraiah و همکاران (۲۰۲۱) اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس برویس MYSN105 جدا شده از فراورده تخمیر

شده است، جدایه لاکتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، نالیدیکسیک اسید، ونکومایسین، سیپروفلوکسازین، استرپتومایسین، سفتریاکسون، کلیندامایسین، نوبیوسین، جنتامایسین و ایمپنم، مقاوم بوده و نسبت به آمپی‌سیلین، سفازولین و سفالوتین، دارای حساسیت نسبی و همچنین نسبت به پنی‌سیلین حساس بود.

اسیدهای چرب، اسیدهای آلی و پراکسید هیدروژن است. بنابراین در مورد لاکتوباسیلوس‌ها، عامل اصلی فعالیت ضد میکروبی تولید باکتریوسین است اما وجود ترکیباتی مانند پراکسید هیدروژن، اسیدهای آلی، اتانول و رقابت برای مواد مغذی نیز در این ویژگی موثر هستند [۳۶،۳۵].

### ۳-۵- مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه لاکتیکی

بر اساس نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی که در جدول ۱ نشان داده

**Table 1** Resistance of the LAB isolate towards some routine antibiotics determined based on the disc diffusion bioassay.

Zone of Inhibition (mm)	Susceptibility profile	Antibiotic (µg)
6.37 ± 0.09 <sup>d</sup>	resistant	Clindamycin (2)
3.45 ± 0.39 <sup>e</sup>	resistant	Gentamicin (10)
0.00 ± 0.00 <sup>f</sup>	resistant	Streptomycin (10)
0.00 ± 0.00 <sup>f</sup>	resistant	Ciprofloxacin (5)
21.91 ± 1.93 <sup>a</sup>	sensitive	Penicillin (10)
0.00 ± 0.00 <sup>f</sup>	resistant	Vancomycin (30)
3.26 ± 0.1 <sup>e</sup>	resistant	Novobiocin (5)
15.94 ± 0.28 <sup>b</sup>	semi resistant	Cefalotin (30)
14.85 ± 0.79 <sup>b</sup>	semi resistant	Ampicillin (10)
14.52 ± 0.05 <sup>b</sup>	semi resistant	Cefazolin (30)
10.13 ± 0.42 <sup>c</sup>	resistant	Ceftriaxone (30)
0.00 ± 0.00 <sup>f</sup>	resistant	Nalidixic acid (30)
2.31 ± 0.19 <sup>e</sup>	resistant	Imipenem (10)
0.00 ± 0.00 <sup>f</sup>	resistant	Kanamycin (30)

Different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) within the column.

توسط Munoz و همکاران (۲۰۱۴)، تمامی جدایه‌های لاکتوباسیلوس پیتوسوس و لوکونوستوک سودومزنترویدس حساسیت بالایی نسبت به آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، جنتامایسین و اریترومایسین نشان دادند. همچنین این جدایه‌ها نسبت به استرپتومایسین و ونکومایسین مقاوم بودند [۳۸]. در پژوهش Li و همکاران (۲۰۱۹) تمام جدایه‌های لاکتوباسیلوس مورد مطالعه نسبت به آمپی‌سیلین، اریترومایسین و کلیندامایسین، حساس بودند در حالی که در برابر استرپتومایسین، کانامایسین و سیپروفلوکسازین از خود مقاومت نشان دادند. همچنین بیشتر گونه‌های لاکتوباسیلوس نسبت به جنتامایسین، مقاوم بودند [۳۹]. همواره این نگرانی وجود دارد که باکتری‌های اسید لاکتیک و بیفیدوباکتری‌ها به عنوان بخشی از جمعیت باکتریایی مواد غذایی و دستگاه گوارش انسان‌ها و حیوانات می‌توانند به عنوان مخزن ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک عمل کنند. این مقاومت در نهایت می‌تواند به باکتری‌های بیماری‌زا و فرصت طلب، منتقل شده و مانع از درمان عفونت‌ها شود. مکانیسم‌های متفاوتی برای مقاومت به آنتی‌بیوتیک گزارش شده

در طی مطالعه Sadeghi و همکاران (۲۰۱۹) لاکتوباسیلوس برویس جدا شده از خمیرترش سبوس برنج، در برابر آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، استرپتومایسین و نالیدیکسیک اسید، مقاوم و نسبت به پنی‌سیلین، حساس بود که مشابه نتایج پژوهش حاضر می‌باشد. البته قابلیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها در مورد آنتی‌بیوتیک‌های نوبیوسین، سیپروفلوکسازین، جنتامایسین، کلیندامایسین و سفتریاکسون در این دو بررسی کاملاً متفاوت بود [۲۰].

در پژوهش Vasiee و همکاران (۲۰۱۸) تمامی جدایه‌ها به ونکومایسین مقاوم بودند. در پژوهش مذکور، هاله عدم رشد نسبت به پنی‌سیلین برای لاکتوباسیلوس برویس B12 معادل ۲۶/۵۶ میلی‌متر، سویه لاکتوباسیلوس برویس B16، ۱۸/۶۷ میلی‌متر و سویه لاکتوباسیلوس برویس C33، ۱۷/۸۵ میلی‌متر بود [۳۷]. در حالی که در پژوهش حاضر، هاله عدم رشد لاکتوباسیلوس برویس SKA01 نسبت به پنی‌سیلین ۲۱/۹۱ بود. این جدایه بیشترین حساسیت را در میان آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمون نسبت به پنی‌سیلین نشان داد. بر اساس نتایج گزارش شده



عنوان کشت میکروبی پروبیوتیک در صنایع تخمیری معرفی نمود.

## ۵- منابع

- [1] Bajaj, B. K., Claes, I. J., & Lebeer, S. (2021). Functional mechanisms of probiotics. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 321-327.
- [2] Gobetti, M., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., & De Angelis, M. (2014). How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. *Food Microbiology*, 37, 30-40.
- [3] Venskutonis, P. R., & Kraujalis, P. (2013). Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: a review on composition, properties, and uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(4), 381-412.
- [4] Sterr, Y., Weiss, A., & Schmidt, H. (2009). Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1), 75-82.
- [5] Vera-Pingitore, E., Jimenez, M. E., Dallagnol, A., Belfiore, C., Fontana, C., Fontana, P., ... & Plumed-Ferrer, C. (2016). Screening and characterization of potential probiotic and starter bacteria for plant fermentations. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 288-294.
- [6] Russo, P., Arena, M. P., Fiocco, D., Capozzi, V., Drider, D., & Spano, G. (2017). Lactobacillus plantarum with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 48-54.
- [7] AACC International. (2010). Approved methods of the American association of cereal chemists. 11th Ed. The St. Paul.
- [8] Ruiz Rodríguez, L., Vera Pingitore, E., Rollan, G., Martos, G., Saavedra, L., Fontana, C., ... & Vignolo, G. (2016). Biodiversity and technological potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented amaranth sourdough. *Letters in Applied Microbiology*, 63(2), 147-154.
- [9] Abnous, K., Brooks, S. P., Kwan, J., Matias, F., Green-Johnson, J., Selinger, L. B., ... & Kalmokoff, M. (2009). Diets enriched in oat bran or wheat bran temporally and differentially alter the composition of the fecal community of rats. *The Journal of Nutrition*, 139(11), 2024-2031.
- [10] Angmo, K., Kumari, A., & Bhalla, T. C.

است اما اینکه کدام مکانیسم در یک سویه باکتریایی خاص، مطرح شود به ماهیت آنتی‌بیوتیک، محل هدف آن و نوع باکتری بستگی دارد که موجب مهار فرآیندهایی نظیر سنتز دیواره سلولی (متداول‌ترین مکانیسم)، سنتز پروتئین، ترجمه، تغییر غشای سلولی، سنتز اسید نوکلئیک و فعالیت متابولیسی می‌شوند [۴۰]. علاوه بر این، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در جنس یا گونه‌های باکتریایی ممکن است به صورت ذاتی موجود بوده و یا از طریق یک یا چند جهش پی در پی و یا با ترکیب ژن‌های جدید به دست آیند. ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک می‌توانند از طریق عناصر قابل انتقال (پلاسمیدها و تراسپوزون‌ها) منتقل شوند [۴۱].

## ۳-۶- قابلیت همولیز خون

در این پژوهش، جدایه لاکتیکی دارای فعالیت همولیزی از نوع گاما بود.

به طور کلی فعالیت همولیز میکروارگانیزم‌ها به ۳ دسته آلفا، بتا و گاما تقسیم می‌شود. مشاهده رنگ سبز نشانگر همولیز آلفا و رنگ زرد یا شفاف، همولیز بتا را نشان می‌دهد. در صورتی که هیچ تغییر رنگی در اطراف جدایه مشاهده نشود همولیز گاما می‌باشد.

طی پژوهش Sharma و همکاران (۲۰۱۹) از بین ۲۶ جدایه لاکتیکی خمیرترش آرد گندم، ۲۰ مورد همولیز منفی و ۶ مورد همولیز مثبت بودند [۴۲]. همچنین در پژوهش دیگری توسط Argyri و همکاران (۲۰۱۳) از بین ۶۹ جدایه مورد مطالعه، اکثر جدایه‌ها همولیز گاما و ۴ سویه لاکتوباسیلوس پنتوسوس B278، B279، B281 و B285 دارای همولیز آلفا بودند و هیچ یک از جدایه‌ها همولیز بتا نداشتند [۴۳]. در بررسی‌های مشابهی لاکتوباسیلوس برویس KT16-2 و لاکتوباسیلوس برویس S82 نیز فاقد فعالیت همولیزی بودند [۴۴، ۴۵]. عدم فعالیت همولیتیک برای طبقه‌بندی باکتری‌ها به عنوان Generally (GRAS) Recognized As Safe طبق قوانین سازمان مواد غذایی اروپا الزامی است.

## ۴- جمع بندی

در این پژوهش، ارزیابی خصوصیات لاکتوباسیلوس برویس به عنوان جدایه لاکتیکی غالب آمارانت تخمیر شده نشان داد که این جدایه از قابلیت‌های پروبیوتیکی مناسبی برخوردار بود. با توجه به زنده‌مانی مناسب این جدایه در شرایط اسیدی و حضور نمک-های صفراوی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک، قابلیت‌های خود اتصالی و دگر اتصالی، اثرات ضد باکتریایی مناسب جدایه لاکتوباسیلوس برویس می‌توان آن را به عنوان یک نامزد بالقوه جهت استفاده به

- cereal-based nigerian fermented food products. *Food Control*, 92, 225-231.
- [20] Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Raeisi, M., & Nematollahi, Z. (2019). Biological control of foodborne pathogens and aflatoxins by selected probiotic LAB isolated from rice bran sourdough. *Biological Control*, 130, 70-79.
- [21] Wang, C., Cui, Y., & Qu, X. (2018). Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Archives of Microbiology*, 200(2), 195-201.
- [22] Patel, A., Prajapati, J. B., Holst, O., & Ljungh, A. (2014). Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional Indian fermented food products. *Food Bioscience*, 5, 27-33.
- [23] Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., ... & Zhang, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21(5), 695-701.
- [24] Menezes, A. G. T., Ramos, C. L., Cenzi, G., Melo, D. S., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2020). Probiotic potential, antioxidant activity, and phytase production of indigenous yeasts isolated from indigenous fermented foods. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12(1), 280-288.
- [25] Vasiee, A., Falah, F., Behbahani, B. A., & 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*, 130(5), 471-479.
- [26] Han, Q., Kong, B., Chen, Q., Sun, F., & Zhang, H. (2017). In vitro comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. *Journal of Functional Foods*, 32, 391-400.
- [27] Zangeneh, M., Khaleghi, M., & Khorrami, S. (2019). Isolation of *Lactobacillus plantarum* strains with robust antagonistic activity, qualified probiotic properties, and without antibiotic-resistance from traditional sourdough. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 6(2), 66-74.
- [28] Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1065-1073.
- [29] Tareb, R., Bernardeau, M., Gueguen, M., & (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 428-435.
- [11] Zhang, Y., Zhang, L., Du, M., Yi, H., Guo, C., Tuo, Y., et al., (2011). Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiological Research*, 167(1), 27-31.
- [12] Jorgensen, J. H., & Turnidge, J. D. (2015). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *Manual of Clinical Microbiology*, 1253-1273.
- [13] Cakır, E., Arıcı, M., & Durak, M. Z. (2020). Biodiversity and techno-functional properties of lactic acid bacteria in fermented hull-less barley sourdough. *Journal of bioscience and bioengineering*, 130(5), 450-456.
- [14] Bartkiene, E., Lele, V., Ruzauskas, M., Domig, K. J., Starkute, V., Zavistanaviciute, P., ... & Rocha, J. M. (2019). Lactic acid bacteria isolation from spontaneous sourdough and their characterization including antimicrobial and antifungal properties evaluation. *Microorganisms*, 8(1), 64.
- [15] Chavan, R. S., & Chavan, S. R. (2011). Sourdough technology—a traditional way for wholesome foods: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(3), 169-182.
- [16] De Vuyst, L., & Nevens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 43-56.
- [17] Fekri, A., Torbati, M., Khosrowshahi, A. Y., Shamloo, H. B., & Azadmard-Damirchi, S. (2020). Functional effects of phytate-degrading, probiotic lactic acid bacteria and yeast strains isolated from Iranian traditional sourdough on the technological and nutritional properties of whole wheat bread. *Food chemistry*, 306, 125620.
- [18] Kowsalya, M., Sudha, K. G., Ali, S., Velmurugan, T., Karunakaran, G., & Rajeshkumar, M. P. (2022). In-vitro assessment of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented rice gruel of south india: Lactic acid bacteria from fermented rice gruel. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, e4908-e4908.
- [19] Adesulu-Dahunsi, A. T., Jeyaram, K., & Sanni, A. I. (2018). Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from

- probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from horreh, a traditional Iranian fermented food. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(2), 258-268.
- [38] Muñoz, M. D. C. C., Benomar, N., Lerma, L. L., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2014). Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 110-118.
- [39] Li, Y., Li, L., Kromann, S., Chen, M., Shi, L., & Meng, H. (2019). Antibiotic resistance of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus thermophilus* isolated from Chinese fermented milk products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(3), 221-228.
- [40] Ammor, M. S., Flórez, A. B., & Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24(6), 559-570.
- [41] van Reenen, C. A., & Dicks, L. M. (2011). Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Archives of Microbiology*, 193(3), 157-168.
- [42] Sharma, K., Attri, S., & Goel, G. (2019). Selection and evaluation of probiotic and functional characteristics of autochthonous lactic acid bacteria isolated from fermented wheat flour dough babroo. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(3), 774-784.
- [43] Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33(2), 282-291.
- [44] Abouloifa, H., Rokni, Y., Bellaouchi, R., Ghabbour, N., Karboune, S., Brasca, M., ... & Asehraou, A. (2020). Characterization of probiotic properties of antifungal *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermenting green olives. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12(2), 683-696.
- [45] Kunduhoglu, B., & Hacıoglu, S. (2021). Probiotic potential and gluten hydrolysis activity of *Lactobacillus brevis* KT16-2. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(3), 720-733.
- Vernoux, J. P. (2013). In vitro characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology*, 62(4), 637-649.
- [30] Somashekaraiah, R., Mottawea, W., Gunduraj, A., Joshi, U., Hammami, R., & Sreenivasa, M. Y. (2021). Probiotic and antifungal attributes of *Levilactobacillus brevis* MYSN105, isolated from an Indian traditional fermented food Pozha. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- [31] Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F., & Jespersen, L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiology*, 36(1), 22-29.
- [32] Tavakoli, M., Hamidi-Esfahani, Z., Hejazi, M. A., Azizi, M. H., & 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.
- [33] Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2008). Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714-728.
- [34] Makras, L., Triantafyllou, V., Favol-Messaoudi, D., Adrian, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., ... & De Vuyst, L. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*, 157(3), 241-247.
- [35] Chi, H., & Holo, H. (2018). Synergistic antimicrobial activity between the broad spectrum bacteriocin garvicin KS and nisin, farnesol and polymyxin B against gram-positive and gram-negative bacteria. *Current microbiology*, 75(3), 272-277.
- [36] Karimi, R., Mortazavian, A. M., & Amiri-Rigi, A. (2012). Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. *Food microbiology*, 29(1), 1-9.
- [37] Vasiee, A., Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, S. A., & Noorbakhsh, H. (2018). Diversity and



## Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus brevis* as the predominant LAB isolated from fermented amaranth

Shayesteh Kia P.<sup>1</sup>, Sadeghi A.<sup>2\*</sup>, Kashaninejad, M.<sup>3</sup>, Khomeiri M.<sup>3</sup>, Zarali M.<sup>4</sup>

1. M.Sc student of Food Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. Associate professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
- 3 and 4. Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
5. Ph.D. student of Food Biotechnology, Department of food science and technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

### ARTICLE INFO

### ABSTRACT

#### Article History:

Received 2022/ 05/ 01  
Accepted 2022/ 06/ 14

#### Keywords:

Predominant LAB isolate,  
Fermented buckwheat,  
Probiotic characteristics.

**DOI:** 10.22034/FSCT.19.132.65  
**DOR:** 20.1001.1.20088787.1401.19.132.5.8

\*Corresponding Author E-Mail:  
Sadeghi.gau@gmail.com

Evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented pseudocereals has crucial importance to prepare microbial cultures. In the present study, after molecular identification, probiotic properties of the predominant LAB isolate were investigated. Sequencing results of the PCR products led to the identification of *Lactobacillus brevis* SKA01 as the predominant LAB. The survival of the LAB isolate after continues treatment of acid and bile reached to  $10^6$  compared to the control sample ( $10^8$  CFU/mL), and it showed the highest antibacterial effect on *Staphylococcus aureus*. Meanwhile, there was no significant difference ( $P>0.05$ ) between inhibitory zone diameter of the *S. aureus* and *Listeria monocytogenes* in the present of the LAB isolate. LAB isolate was capable of good auto-aggregation (36.19%) and co-aggregation with *S. aureus* (71.24%), and it had no hemolytic activity. Furthermore, it was resistant to most of the tested antibiotics. By considering the proper probiotic potentials of the *L. brevis* isolated from fermented amaranth, it is possible to use the isolate as microbial starter or probiotic culture in fermentation industries.