مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی، ضدمیکروبی و ایمنی سویه *Levilactobacillus brevis* KKP 3945 جداسازی شده از ماست محلی

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

۱. دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.

۲. استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.

۳. دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۳

کلمات کلیدی:

Levilactobacillus brevis،

فعالیت ضدمیکروبی،

مقاومت به اسید،

مقاومت به نمک‌های صفراوی.

DOI:10.22034/FSCT.21.157.82.

* مسئول مکاتبات:

B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی پتانسیل پروبیوتیکی سویه *Levilactobacillus brevis* KKP 3945 جدا شده از ماست محلی انجام شد. ابتدا سویه، از نظر ویژگی‌های پروبیوتیکی از قبیل مقاومت به اسید (pH ۲، ۳ و ٤)، هیدروفوبیسیتی، مقاومت به صفرا (۰/۳، ۰/۵و۰/۷)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH و ABTS) و جذب کلسترول مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت ضدمیکروبی (دیسک دیفیوژن آگارو چاهک آگار) سویه در مقابل ٦ پاتوژن شاخص غذایی (*Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis*، *Listeria monocytogenes*، *Salmonella typhimurium* و *Shigella dysenteriae*) بررسی شد. توانایی تولید آمین بیوژنیک، عدم فعالیت همولیتیک و DNase نیز ارزیابی شد. بر اساس نتایج، در غلظت ۰/۵٪ نمک‌های صفراوی از رشد سویه جلوگیری شد. با کاهش pH از ٤ به ۲، کاهش قابل توجهی در تعداد سلول‌های زنده مشاهده شد و از ۹/۳۰ به ۸/۷۸ Log CFU/mL کاهش یافت. علاوه بر این، تعداد سلول‌های زنده سویه در pH ٤ با افزایش زمان از صفر به ۳ ساعت از ۹/۳۰ به ۸/۲۵ Log CFU/mL کاهش یافت. بیشترین اثر بازدارندگی سویه در مهار باکتری *S. aureus* و کمترین بازدارندگی بر *E. coli* مشاهده شد. پاسخ به‌دست آمده از فعالیت همولیتیکی و DNase منفی بوده و میزان توانایی سویه در کاهش میزان کلسترول ۰/٦ ± ٤٤/٤٤ به‌دست آمد. میزان درصد مهار رادیکال‌های آزاد در روش DPPH و ABTS به ترتیب،٤٨/٣ و ٥٠/٥٠ بود. *Lev. brevis* KKP 3945 نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نیتروفورازون، نالیدیکسیک، پنیسیلین و سیپروفلوکساسین حساس بود. نتایج نشان داد *Lev. brevis* KKP 3945 ویژگی‌های پروبیوتیکی قابل قبولی داشت و می‌توان از آن به‌عنوان یک باکتری پروبیوتیک در محصولات غذایی بهره برد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

۱-مقدمه

در طول سال‌های اخیر، محصولات تخمیری به دلیل ارزش غذایی بالا و نیز اثرات زیست‌فعال مثبت توسط پژوهشگران مورد توجه قرار گرفته است. محصولات تخمیر شده معمولا حاوی طیف وسیعی از باکتری‌های اسیدلاکتیک بوده و اسید لاکتیک را به عنوان محصول نهایی اصلی تولید می‌کنند [۱]. باکتری‌های اسید لاکتیک؛ باکتری‌هایی گرم مثبت، میکروآئروفیلیک و غیرهاگزا بوده که ترکیب باز DNA آن‌ها کمتر از ۵۰ ٪ مولی گوانین وسیتوزین (G+C) می‌باشد و عموماً فاقد کاتالاز هستند. هرچند مواردی از کاتالاز کاذب[1] در کشت‌هایی که غلظت قند در آن‌ها کم بوده، مشاهده شده است [۲]. اکثر سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک غیر پاتوژن بوده و در فرآیند تخمیر مواد غذایی چه بصورت صنعتی و چه بصورت سنتی نقش بسزایی دارند و جز باکتری‌های مفید در نظر گرفته می‌شوند [۳]. 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 [٤]. باتوجه به کاربرد لاکتوباسیلوس‌ها در صنایع تخمیری به ویژه صنعت لبنیات و حضور این باکتری‌ها در دستگاه‌های گوارش پستانداران، پژوهش‌های گسترده‌ای در خصوص مطالعه اثر این باکتری‌ها بر پاتوژن‌ها و همچنین تأثیر آن‌ها بر سلامت میزبان صورت گرفته است. در این بررسی‌ها مشخص گردیده که سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس قادرند به خوبی از رشد باکتری‌های بیماری‌زا از جمله *Staphylococcus aureus* و سویه‌های مهاجم *Escherichia coli* ممانعت به عمل آورند [۵].

غذاهای تخمیری سنتی بر پایه لبنیات، منابع غنی از فلور لاکتیکی بومی هستند [٦]. 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 و همچنین اثر ضدمیکروبی نیز می‌باشند [۷]. با توجه به توسعه صنایع لبنی در کشور و ترویج فرهنگ بهداشت مواد غذایی و احتمال آلودگی در فرآورده‌های لبنی سنتی، مصرف فرآورده‌های لبنی حاصل از این صنعت در نقاط مختلف کشور جایگزین مصرف فرآورده‌های لبنی سنتی شده و تولید این محصول‌ها بطور چشمگیری کاهش یافته است. اگرچه گونه‌های تجاری بسیاری از پروبیوتیک‌ها در بازار وجود دارد، اما جلوگیری از حذف تدریجی سویه‌های بومی باکتری‌های اسید لاکتیک، جداسازی و حفظ آن‌ها برای کاربردهای آتی که بتواند خواص منحصر به فردی را ارائه دهد از اهمیت بسیاری برخوردار است [۸]. در نظر گرفتن یک میکروارگانیسم به عنوان سویه پروبیوتیک، مستلزم انجام آزمایش‌های برون‌تنی[2] و تأیید آن‌ها طی آزمایش‌های درون‌تنی[3] می‌باشد. طبق قوانین سازمان بهداشت و خوار و بار انسانی، ارزیابی اولیه ویژگی‌های پروبیوتیکی هر میکروارگانیسم، در شرایط آزمایشگاهی و در چهار چوب قوانین مذکور پیش از انجام آزمایش‌های درون‌تنی، اجباری می‌باشد. ویژگی‌هایی که برای در نظر گرفتن یک سویه به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته می‌شوند شامل زنده‌مانی باکتری در طول مراحل تهیه فرآورده عملگرا، زنده ماندن در

1 -Pseudo- catalase
2- *In vitro*
3- *In vivo*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]
[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

دستگاه گوارش، توانایی اتصال به سلول‌های اپیتیال روده و همچنین توانایی مقابله با عوامل بیماری‌زا می‌باشد. با توجه به اهمیت توصیف سویه‌های جدید پروبیوتیکی هدف از این پژوهش آزمایشگاهی بررسی پتانسیل پروبیوتیکی (مقاومت به اسید، مقاومت به نمک‌های صفراوی، جذب کلسترول، هیدروفوبیسیتی، تولیدآمین بیوژنیک، فعالیت DNase و عدم فعالیت همولیتیک، ارزیابی فعایت آنتی‌اکسیدانی، جذب کلسترول و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی) و فعالیت ضدمیکروبی سویه *Levilactobacillus brevis* KKP 3945 جدا سازی شده از ماست محلی تشان علیه پاتوژن‌های شاخص غذایی (*Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis*، *Listeria monocytogenes*، *Salmonella typhimurium* و *Shigella dysenteriae*) می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جداسازی و شناسایی سویه *Lev. brevis* KKP 3945

روش جداسازی و شناسایی سویه مورد نظر مطابق با مطالعه سبکتکین و همکاران (۲۰۲۱)، انجام شد. میزان ۵ گرم از نمونه ماست محلی به پپتون واتر (۰/۱ ٪؛ ٤٥ میلی‌لیتر) اضافه و نمونه‌ها هموژنیزه شدند و پس از آماده‌سازی رقت‌ها (10^{-1}–10^{-6}) 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 ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات و افزودن محلول آنزیمی مناسب جهت رسیدن به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، طبق پروتکل شرکت سازنده، عمل گردید. از پرایمرهای عمومی[4] که بر اساس نواحی حفظ شده 16S rRNA طراحی شده‌اند استفاده گردید. واکنش زنجیره ای پلیمراز[5] در کیت PCR در حجم نهایی ۲۵/۱۵ میکرولیتر انجام گرفت. میکروتیوب حاوی PCR داخل دستگاه ترموسایکلر[6] قرار گرفت و برنامه دمایی مطابق با مطالعه سبکتکین و همکاران (۲۰۲۱)، 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[7] (۳۰ ثانیه در۹٤ درجه سانتی‌گراد)، اتصال پرایمر (۳۰ ثانیه 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[8] رویت شد [۹]. نتایج نشان داد که ایزوله با خواص کاتالاز منفی و گرم مثبت با میزان شباهت ۹۸ درصد متعلق به سویه *Lev. brevis* KKP 3945 است.

۲-۲-آزمون مقاومت به اسید

آزمون مقاومت به اسید مطابق با روش برزگر و همکاران (۲۰۲۱)، انجام شد. جهت بررسی مقاومت به اسید، ابتدا سویه مورد نظر به طور جداگانه به مدت ۱۸ تا ٢٤ ساعت در ۵ میلی‌لیتر محیط MRS مایع در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط بی‌هوازی کشت داده شد. باکتری‌های رشد یافته در ٦٠٠٠g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. رسوب ایجاد شده دو بار توسط محلول نمک فسفات بافری[9] (سیگما – آلدریچ) شست و شو داده شده و در نهایت سوپرناتانت دور ریخته شد. سوپانسیون میکروبی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ٦٢٠ نانومتر به جذب نوری ۰/٦ رسید. ۵۰ میکرولیتر از

4-Universal-Primer
5- Polymerase Chain Reaction
6- Thermocycler
7 -Denaturation
8- Gel Documentation System
9- Phosphate buffered saline

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]
[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

سوسپانسیون میکروبی به درون میکروتیوب حاوی ٤٥٠ میکرولیتر محلول نمک فسفات بافری (PBS) ریخته شده که به عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته خواهد شد. سپس نمونه کنترل به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه‌گذاری شد [۱۰]. از HCl (۰/۱ نرمال)، توسط محلول نمک فسفات بافری (PBS)، اسیدهایی با pHهای ۲، ۳ و ٤ تهیه شد. در میکروتیوب‌های حاوی ٤٥٠ میکرولیتر PBS استریل با pH های مورد نظر میزان۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی ریخته شد و همراه با نمونه کنترل انکوبه‌گذاری شد. پس از گذشت ۳ ساعت، برای نمونه ها تا 10^{-9} رقت‌سازی انجام شد. در انتها از رقت‌های مورد نظر به میزان ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون در پلیت‌های حاوی MRS آگار کشت خطی داده شد و بعد از ٢٤ ساعت در جار بی‌هوازی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه‌گذاری شد و تعداد باکتری *Lev. brevis* KKP 3945 رشد یافته شمارش شد.

۲-۳- آزمون مقاومت به صفرا

نمک‌های صفراوی با غشای سلول زنده واکنش داده و به همین دلیل مولکول‌هایی با فعالیت ضدمیکروبی محسوب می‌شوند. در نتیجه بررسی مقاومت سویه به نمک‌های صفراوی، به عنوان شاخصی برای زنده‌مانی میکروارگانیسم ضروری می‌باشد. در این روش پس از فعال‌سازی سویه مورد آزمایش در محیط گرمخانه‌گذاری به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد، سوسپانسیون میکروبی مورد نظر (۵ دقیقه با دور ۹۰۰۰g در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) سانتریفوژ گردید. با حذف محیط کشت، رسوب باقی‌مانده با محلول بافر فسفات استریل شست و شو و دوباره سانتریفیوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده بر محیط‌های MRS آگار حاوی ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ درصد از نمک صفراوی کشت داده شد. پلیت‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. پس از اتمام مدت زمان گرمخانه‌گذاری، نتایج به‌صورت چشمی مشاهده شده و از پلیت فاقد نمک صفراوی به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید [۱۱].

۲-٤- هیدروفوبیستی سطح سلول[10]

هیدروفوبیستی سطحی به عنوان شاخصی از تمایل باکتری‌ها جهت اتصال به حلال‌های غیرقطبی مطرح می‌شود. در حقیقت، هیدروفوبیستی بالا، این پتانسیل را به آن‌ها می‌دهد که از محیط آبی به محیط آلی یا غیر قطبی نقل مکان کرده و باکتری را قادر می‌سازد به ذرات هیدروکربنی روی سلول یا سطوح مخاطی بچسبد. پس از رشد باکتری در MRS آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ١٦ تا ١٨ ساعت ، در ٦٠٠٠ rpm به مدت ١٢ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس توسط محلول نمک فسفات بافری استریل و سرد شستشو و مجددا به صورت سوسپانسیون در آمدند و جذب آن‌ها در ٦٠٠ نانومتر بر روی ٠/٦ تنظیم گردید (A_1). ٤ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر باکتری با ۲ میلی‌لیتر n -هگزادکان مخلوط و سپس به مدت دو دقیقه ورتکس شد. پس ازآن مخلوط ۱ ساعت در دمای محیط قرار گرفتند تا انتقال باکتری بین دو فاز انجام شود و سپس جذب محلول آبی در ٦٠٠ نانومتر قرائت گردید (A_2). هیدروفوبیستی با رابطه زیر محاسبه شد[۱۲]:

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

۲-۵- تولید آمین بیوژنیک [11]

آمین‌های بیوژنیک ترکیبات مهم برای عملکردهای فیزیولوژیکی و متابولیکی در تمام ارگانیسم‌های زنده هستند که در اثر متابولیسم برخی از اسیدهای آمینه و واکنش دکربوکسیلاسیون[12] در طول تخمیر و یا فساد مواد غذایی تولید می‌شوند. کنترل تجمع آمین‌ها در فرآورده‌های تخمیری که بخش اعظم آمین‌های بیوژن در موادغذایی را هیستامین

10 -Cell surface hydrophobicity
11-Biogenic amine
12-Decarboxylation

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]
[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

تشکیل می‌دهد یکی از چالش‌های حاضر در صنعت غذا می‌باشد. توانایی سویه‌های لاکتوباسیلوس برای تولید آمین بیوژنیک با دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه روی محیط طراحی شده توسط برزگر و همکاران (۲۰۲۰)، که حاوی آمینواسیدهای پیش ساز از جمله ال-هیستیدین مونوهیدروکلراید، نمک تیروزین دی سدیم، ال-اورنیتین، مونوهیدروکلراید و ال-لیزین مونوهیدروکلراید انجام شد. ابتدا سویه *Lev. brevis* KKP3945 دو بار در محیط کشت MRS مایع حاوی ۰/۱٪ از هر اسید آمینه پیش ساز و ۰/۰۰۵ ٪ پیریدوکسال ۵-فسفات کشت شدند. پس از آن سویه‌ها روی MRS آگارهای با و بدون اسیدهای آمینه که حاوی ۰/۰۶ بروموکرزول بنفش (سیگما) بودند، تشخیص داده شدند. پس از ۲ تا ۵ روز انکوباسیون، رنگ بنفش به دست آمده در کلنی‌های اطراف به عنوان تست مثبت در نظر گرفته شد [۱۰].

۲-۶- تست دئوکسی ریبونوکلئاز[۱۳] و عدم فعالیت همولیتیک[۱۴]

تعیین فعالیت DNase و فعایت همولیتیک، مطابق با مطالعه وسیعی و همکاران (۲۰۲۰)، انجام شد. ابتدا سویه *Lev. brevis* KKP 3945 روی محیط کشت به صورت خطی کشت داده شد. بررسی تولید آنزیم پس از انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت انجام شد. پلیت‌ها با ناحیه شفاف و صورتی در اطراف کلنی‌ها، DNase مثبت گزارش شد.

اهمیت آزمون عدم فعالیت همولیتیک، در بررسی عدم تجزیه‌کنندگی خون و در نتیجه عدم بیماری‌زایی توسط سویه جداسازی شده می‌باشد. بررسی عدم فعالیت همولیتیک سویه *Lev. brevis* KKP 3945 با کشت خطی روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار[15] (مرک آلمان) با ۷ درصد (v/v) خون گوسفند انجام شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها از نظر وجود هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها بررسی شدند. تغییرات رنگی ایجادشده مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل هاله شفاف، هاله سبز رنگ یا عدم تشکیل هاله در اطراف کلنی ها به ترتیب نشان دهنده β-hemolysis، α-hemolysis و γ-hemolysis است. در این آزمون از باکتری های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* به عنوان نمونه کنترل برای β-hemolysis و α-hemolysis استفاده شد[۱] .

۲-۷- ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی توسط مهار رادیکال DPPH[۱۶] و ABTS[۱۷]

به طور خلاصه، میزان یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی سویه مورد نظر در آب مقطر استریل با جمعیتی معادل $۱۰^۹$ cfu/ml، به ۲ میلی‌لیتر از محلول متانولی معادل DPPH با غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار اضافه شد. همچنین میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از روماند فیلتر شده به ۳/۹ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۱ میلی‌مولار DPPH اضافه گردید و پس از مخلوط نمودن با شیکر در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک نگهداری شد. از مخلوط آب مقطر و محلول به DPPH به عنوان کنترل استفاده شد. همچنین نمونه‌های شاهد تنها حاوی متانول و سلول‌های باکتریایی بودند. جذب هر یک از محلول‌های مورد آزمون پس از سانتریفیوژ (g ۸۰۰۰ به مدت۱۰دقیقه) در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۳].

در روش ABTS، 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 [١٦]. برای محاسبه درصد مهار رادیکال‌های آزاد از فرمول زیر استفاده گردید:

13 -DNase
14 -Hemolytic activity
15- Tryptic Soy Agar
16- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
17- 2,2-azinobis ethylbenzothiazline-6-sulfonic acid

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]
[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

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

۲-۸- جذب کلسترول

میزان جذب کلسترول بر اساس مطالعه علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۳)، انجام شد. به این منظور محیط کشت MRS مایع به طور جداگانه استریل شد. پس از آن Oxgall(۰/۳٪)، همراه با پلی‌اکسی اتانیل-کلستریل سبکات به MRS مایع اضافه شد. کلسترول محلول با غلظت نهایی ۱ درصد به مایع MRS حاوی ۰/۳ درصد نمک صفرا اضافه شد. کشت (۱٪) تلقیح شد و سپس در ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت در شرایط بی‌هوازی انکوبه شد. شاهد مایع استریل بود که تلقیح نشده بود. در نهایت میزان کلسترول باقی‌مانده در محیط از فرمول زیر بدست خواهد آمد[۱٤].

$$\text{میزان کلسترول} = \frac{\text{غلظت ثانویه} - \text{غلظت اولیه}}{\text{غلظت اولیه}} \times 100$$

۲-۹- آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها

مقاومت آنتی‌بیوتیکی با سرعت نگران کننده‌ای در حال توسعه است و به یک نگرانی رو به رشد در زمینه بهداشت عمومی تبدیل شده است. برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک در برابر یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاوم هستند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی ممکن است به‌طور طبیعی اتفاق بیفتد یا توسط مکانیسم‌های ژنتیکی مانند انتقال ژن از طریق پلاسمیدها حاصل شود. به‌منظور بررسی حساسیت *Lev. brevis* KKP3945 به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی، ابتدا از کشت جامد ۲٤ ساعت میکروارگانیسم، سوسپانسیونی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از آن روی محیط MRS آگار کشت سطحی داده شد. بعد از این مرحله دیسک‌های آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (µg/mL) ۱۰، کلرامفنیکل (µg/mL) ۳۰، پنیسیلین(µg/mL) ۱۰، ونکوسین (µg/mL) ۳۰، نیتروفورازون (µg/mL) ۳۰۰، نالیدیکسیک (µg/mL) ۳۰، ایمیپنیم (µg/mL) ۱۰و سیپروفلوکساسین (µg/mL) ۵، توسط پنس استریل روی محیط کشت قرار داده شد و با کمی فشار ثابت گردیدند. پلیت‌ها در جار بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از گذشت ۲٤ ساعت قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با خط‌کش اندازه‌گیری شده و نتایج بر حسب میلی‌متر گزارش شد [۱۵].

۲-۱۰- ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی سویه *Lev. brevis* KKP 3945

در این پژوهش از باکتری‌های پاتوژن *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis*، *Listeria monocytogenes*، *Shigella dysenteriae* و *Salmonella typhimurium* جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی به دو روش چاهک آگار[18] و دیسک دیفیوژن آگار[19] استفاده شد.

۲-۱۰-۱- تهیه روماند سویه *Lev. brevis* KKP 3945

برای تهیه روماند، ابتدا سویه *Lev. brevis* KKP 3945 در ۱۰ میلی‌لیتر محیط MRS مایع تلقیح و به مدت ۲٤ساعت 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 [۱۳].

۲-۱۰-۲- ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی به روش چاهک آگار

۵۰ میکرولیتر از کشت فعال باکتری های شاخص بیماری زا با رقتی معادل نیم مک‌فارلند (CFU/mL ۱/۵×۱۰^۸) در

18 -Well diffusion agar
19-Disk diffusion agar

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

سطح پلیت حاوی محیط کشت MHA تلقیح و به کمک سوآپ استریل به خوبی پخش شد. سپس چاهک‌هایی با قطر ٦ mm و با استفاده از انتهای پیپت استریل در پلیت‌ها ایجاد شد و روماند سویه 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 پس از آن به گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مناسب برای رشد سویه‌های شاخص، منتقل شدند. پس از طی ٢٤ ساعت هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف چاهک‌ها به کمک خط‌کش اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر گزارش گردید [١٦].

۲-۱۰-۳- ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی به روش دیسک دیفیوژن آگار

جهت ارزیابی خواص ضدمیکروبی سویه در برابر باکتری های بیماری‌زای ذکر شده به روش دیسک دیفیوژن آگار، جمعیت شاخص‌های باکتریایی با روش جذب‌خوانی به معادل استاندارد نیم مک فارلند تنظیم گردید. در مرحله بعد، دیسک‌های کاغذی استریل (پادتن طب، ایران) حاوی روماند سویه با فاصله معین از لبه پلیت در سطح محیط کشت حاوی باکتری‌های شاخص قرار داده شد. نهایتاً پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و قطر هاله عدم رشد نیز با خط کش اندازه‌گیری گردید [١٦].

۲-۱۱- 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 ۲۰۱٦ رسم شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آزمون مقاومت به اسید

میزان زنده‌مانی *Lev. brevis* KKP3945 در pHهای مختلف، در شکل ۱، نشان داده شده است. باکتری‌های اسید لاکتیک برای انجام عملکردهای پروبیوتیکی خود، باید توانایی مقابله با pH پایین دستگاه گوارش را داشته باشند. در نتیجه، مقاومت اسیدی باکتری‌های اسید لاکتیک نه تنها برای رشد خود آن‌ها، بلکه جهت تخمیر و تولید محصولات پروبیوتیک بسیار مهم است.

بقای *Lev. brevis* KKP3945 به طور قابل توجهی تحت تاثیر pH و زمان قرار گرفتن در معرض pH بود. با کاهش pH از٤ به ۲، کاهش قابل توجهی در تعداد سلول‌های زنده مشاهده شد به طوری که میزان زنده مانی از ۹/۳۰ به ۸/۷۸ Log CFU/mL کاهش یافت. علاوه بر این، تعداد سلول‌های زنده سویه با افزایش زمان از صفر به ۳ ساعت از۹/۳۰ به ۸/۲۵ Log CFU/ml کاهش یافت. یکی از معیارهای اصلی انتخاب باکتری‌های پروبیوتیک، زنده‌مانی در pH پایین دستگاه گوارش است. باکتری‌ها با مکانیسم‌های مختلفی شرایط pH پایین را تحمل می‌کنند که یکی از مهمترین این مکانیسم‌ها برای گونه‌های لاکتوباسیل سیستم F0F1-ATPase است. نوشاد و همکاران (۲۰۲۱)، گزارش کردند که ویژگی مقاومت به شرایط اسیدی وابسته به سویه بوده و برای هر باکتری به‌صورت مجزا باید مورد بررسی قرار گیرد. همچنین گزارش شد *Lactiplantibacillus plantarum* و *Lev. brevis*، نسبت به پدیوکوکوس مقاومت بالاتری نسبت به pH پایین دارند [۱۵]. در مطالعه مشابه‌ای، سینگ و همکاران (۲۰۲۰)، گزارش کردند که *Lev. brevis* ATCC14869 جدا شده از کلم ترش، قادر به رشد و زنده ماندن در pH پایین است [۱۷].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]
[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

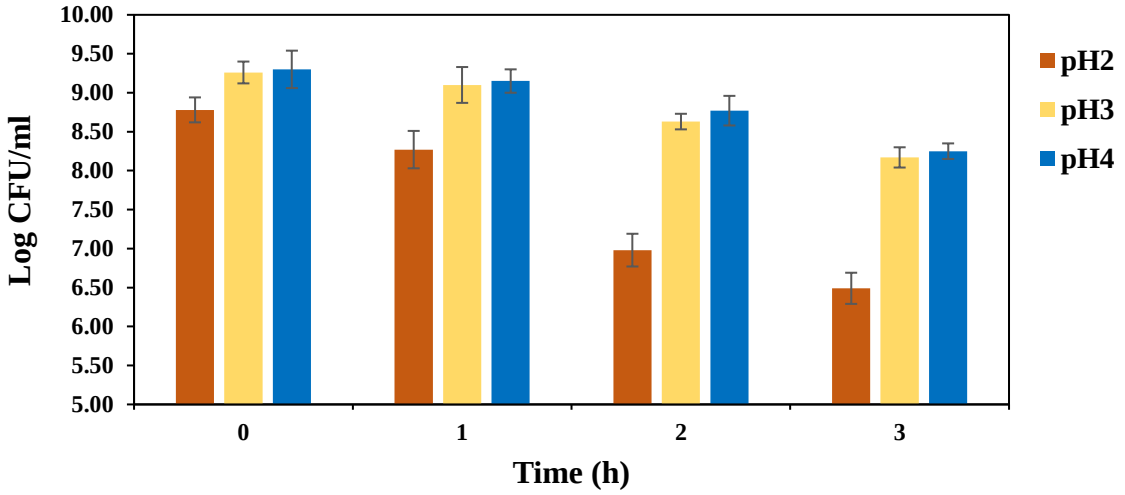

Fig. 1. The capacity of *Levilactobacillus brevis* KKP 3945 to endure in an acidic pH environment.

۳-۲- آزمون مقاومت به صفرا

نمک‌های کیسه صفرا با از بین بردن میکروارگانیسم‌ها، نقش مهم و اساسی در دفاع اختصاصی روده ایفا می‌کنند، بنابراین بررسی زنده‌مانی سویه در غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی برای اثبات پتانسیل پروبیوتیکی ضروری است [۱۸]. نمک‌های صفراوی در هضم ترکیبات چربی دوست می‌شوند ولی گاها نوعی خاصیت آنتی‌بیوتیکی از خود نشان داده و مانع از رشد میکروبیوتای دستگاه گوارش می‌شوند. در این پژوهش از غلظت های ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ درصد 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* KKP 3945 در غلظت‌های پایین نمک‌های صفراوی رشد خوبی دارد. در این پژوهش رشد سویه مورد آزمایش با افزایش درصد نمک صفراوی، از ۰/۳ درصد به ۰/۵ درصد متوقف شد. با توجه به اینکه غلظت نمک صفراوی در بدن معمولاً از ۰/۳٪ تجاوز نمی‌کند، پایداری قوی سویه می‌تواند به دلیل ظرفیت آن در تبدیل نمک‌های صفراوی به کلسترول و اسیدهای آمینه باشد [۱۹]. این پژوهش با یافته‌های سوماشکرایاه و همکاران (۲۰۲۱)، همسو بود. این پژوهشگران گزارش کردند که سویه *Lev. brevis* MYSN105دارای خواص پروبیوتیکی قابل توجهی به ویژه پایداری در محیط‌های اسیدی و غنی از صفرا است [۲۰].

Table 1. The ability of *Levilactobacillus brevis* KKP 3945 to endure varying concentrations of bile salts

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

۳-۳- هیدروفوبیسیتی سطح سلول

هیدروفوبیسیتی یکی از فاکتورهای مهم برای باکتری‌ها جهت چسبندگی به سطوح مختلف است.هیدروفوبیسیتی به فاکتورهای متعددی از قبیل نیروی واندروالس، حرکت

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

براونی، بار الکتریکی سطح و نیروی گرانشس بستگی دارد. لذا در مورد باکتری‌ها باید به صورت مجزا این ویژگی بررسی گردد [۱۵]. 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 [۱۰]. آب‌گریزی نتیجه تعامل بین باکتری و سلول میزبان است و می‌تواند در شرایط آزمایشگاهی با مخلوط کردن سوسپانسیون سویه‌های باکتری با یکی از ترکیبات غیرقطبی ذکر شده از طریق خواندن جذب محلول آبی (OD_{600nm}) قبل و بعد از اختلاط محاسبه شود. کاهش جذب سوسپانسیون بعد از قرار گرفتن سلول در معرض هیدروکربن نشان دهنده خاصیت هیدروفوبی باکتری می‌باشد که در مورد سویه *Lev. brevis* KKP 3945 میزان ۰/۶۰±۵۸/۵ درصد بود. در مطالعه ای مشابه، *Lev. brevis* جدا شده از سرکه زالزالک، آبگریزی سطحی ۴۶/۲۹٪ برای n-هگزادکان نشان داد [۲۱]. علاوه بر این، پژوهش انجام شده توسط فادری و همکاران (۲۰۲۳)، نشان داد که آبگریزی *Lev. brevis* مشتق شده از کلم ترش، ۵۱ درصد بود [۲۲]. ویژگی‌های آبگریز باکتری‌های پروبیوتیک می‌تواند یک ارزیابی اولیه از پتانسیل آن‌ها برای اتصال به سلول‌های اپیتلیال باشد.

۳-٤- جذب کلسترول

اگرچه کلسترول جزء ضروری بافت بدن است، اما کلسترول بالا علت اصلی بیماری‌های قلبی عروقی و شایع‌ترین علت مرگ و میر در جهان است. درمان دارویی برای کاهش سطح کلسترول معمولا موثر است، ولی مصرف طولانی مدت دارو ممکن است باعث شود بدن در معرض خطر قرار گیرد. یکی از متداول‌ترین روش‌های امروزه مصرف غذاهای تخمیر شده حاوی باکتری‌های پروبیوتیک است [۲۳و ۲٤]. باکتری‌های اسید لاکتیک‌ها منجر به بهبود انتقال روده، تعادل فلور روده و حفظ تعادل اسید-باز در روده بزرگ شناخته شده‌اند و منجر به تنظیم سیستم ایمنی و کاهش سطح کلسترول سرم می‌شوند [۱٦]. نتایج این پژوهش نشان داد میزان توانایی *Lev. brevis* KKP 3945 در کاهش میزان کلسترول ۰/٦ ± ٤٤/٤٤ درصد بود. نتیجه به دست آمده با نتایج مشابه موجود، مبنی بر توانایی سویه‌های *Lev. brevis* در کاهش کلسترول مطابقت دارد [۲۵]. 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 [٦]. بررسی‌های آزمایشگاهی متعدد، مکانیسم‌های مختلفی را پیشنهاد کرده‌اند که می‌توانند آثار کاهش‌دهنده کلسترول باکتری‌های پروبیوتیک را توضیح دهند. این مکانیسم‌ها شامل جذب کلسترول، اتصال کلسترول به دیواره سلولی باکتری، تبدیل میکروبی کلسترول به کوپروستانول و فرآیند آنزیمی دکونژوگاسیون نمک صفراوی می‌باشد [۲٦]. فعالیت هیدرولیز نمک صفراوی باکتری‌های پروبیوتیک عامل مهمی است که برای کاهش کلسترول باید در نظر گرفته شود، زیرا به نظر می‌رسد میکروارگانیسم‌هایی که فاقد قابلیت دکونژوگاسیون هستند قادر به حذف کلسترول از محیط کشت نیستند [۱۰].

۳-۵- ارزیابی پتانسیل آنتی اکسیدانی DPPH و ABTS

میزان درصد مهار رادیکال‌های آزاد توسط *Lev. brevis* KKP 3945 در شکل ۲، آورده شده است. لی و همکاران (۲۰۱۲)، در مطالعه خود بیان کردند که توانایی سلول‌های دست نخورده برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد با مواد موجود در سطح سلول‌های باکتریایی مانند پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها، و اسید لیپوتیکوئیک مرتبط است [۲۳].نشان داده شده است که مواد آنتی‌اکسیدانی تولید شده توسط سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک شامل NADH، NADPH، Mn^{+2}، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، اگزوپلی ساکاریدها و ترکیبات زیست فعال می‌باشد [۲٤].

بر اساس پژوهش‌های مشابه همه باکتری‌های اسید لاکتیک دارای فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد هستند. توانایی محافظتی پروبیوتیک در برابر استرس اکسیداتیو با مهار

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

گونه‌های فعال اکسیژن[20]، شلاته کردن یون فلزی و کاهش اتوکسیداسیون آسکوربات توجیه می‌شود. اجزای آنتی‌اکسیدانی موجود در باکتری‌های اسید لاکتیک، اگزوپلی ساکاریدهای باکتریایی، پپتیدهای فعال زیستی، آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و منگنز هستند. علاوه بر این، میکرو فلور روده می‌تواند آنتی اکسیدان‌های غذایی فعال زیستی را از طریق فرآیندهای تبدیل زیستی با استفاده از واکنش‌های مختلف آنزیمی تولید کند [۱۷].

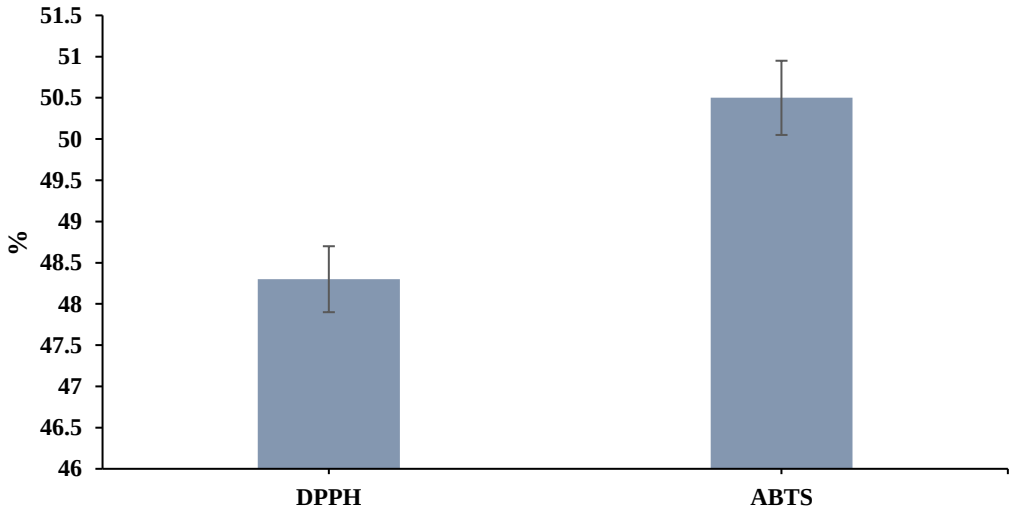

Fig. 2. The antioxidant activity (DPPH & ABTS) of *Levilactobacillus brevis* KKP 3945.

۳-۶- تست دئوکسی ریبونوکلئاز و فعالیت همولیتیک

بر اساس نتایج به دست آمده، تولید DNase توسط *Lev. brevis* KKP 3945 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 به دست 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. نتایج مشابه نشان داده‌اند که اکثر سویه‌های لاکتیک اسید فعالیت همولیتیکی ندارند [۲۷]. در مطالعه 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 و تولید آمین بیوژنیک را نشان نداد[۱۶]. 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 [۲۸]. عدم فعالیت همولیتیک برای پروبیوتیک‌ها ضروری است به این دلیل که همولیز می‌تواند موجب افزایش دسترسی ارگانیسم به آهن شود و این امر می‌تواند منجر به شرایط کم‌خونی و اِدم در انسان شود [۲۹].

۳-۷-تولید آمین بیوژنیک

در پژوهش حاضر، تولید آمین بیوژنیک توسط *Lev. brevis* KKP 3945 مشاهده نشد. آمین بیوژنیک، عمدتاً از آمیناسیون و ترانس آمیناسیون آلدئیدها و کتون ها یا

20- Reactive oxygen species

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

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 [۱۰]. ممکن است آمین بیوژنیک در غذاهای مربوط به ماهی، سوسیس‌های تخمیری، پنیر و برخی دیگر از غذاهای تخمیری حضور داشته باشد. عدم وجود هیستامین و تیرامین معمولا برای بررسی اثرات سمی و آلرژیک آن بیشتر مورد بررسی قرار گرفت. اگرچه تولید آمین بیوژنیک توسط برخی از سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک مانند انتروکوک و لاکتوباسیلوس گزارش شده است، اما عدم وجود آن‌ها در غذا یک اصل مهم است.

در پژوهشی مشابه، علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۳)، گزارش کردند *Lev. brevis* HL6 تولید آمین بیوژنیک را نشان نداد[۱٦]. 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. علیرغم این ویژگی‌های مطلوب، مصرف غذاهای حاوی مقادیر زیاد آمین‌های بیوژنیک می‌تواند سبب آزاد شدن آدرنالین و نورآدرنالین، تحریک ترشح اسید معده، افزایش برون‌ده قلبی، میگرن، افزایش سطح قند خون و فشارخون شود [۳۰]. به طور کلی، "مصرف بیش از حد" یک آمین ممکن است تمام افراد را در معرض خطرقرار دهد. با این حال، مردمی که دستگاه گوارش آن‌ها مشکل دارد، چون‌که فعالیت اکسیدازی در روده آن‌ها معمولا کمتر از افراد سالم است، بیشتردر معرض خطر هستند. همچنین افرادی که دارای مشکلات تنفسی و عروق کرونری، فشار خون بالا و یا کمبود ویتامین B12 دارند به دوزهای پایین‌تر آمین‌های بیوژنیک حساسیت بیشتری را نشان می‌دهند [۳۱].

۳-۸- آزمون ضدمیکروبی

نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی سویه *Lev. brevis* KKP 3945بر باکتری‌های بیماری‌زا به روش انتشار به کمک چاهک آگار و دیسک دیفیوژن در شکل ۳ و ٤ نشان داده شده است. هنگام در نظر گرفتن پتانسیل پروبیوتیک‌ها برای اصلاح و ایجاد تعادل میکروبیوتای روده، ویژگی‌های ضد میکروبی آن‌ها را در برابر پاتوژن‌های مضر بسیار حائز اهمیت است. توانایی ضدمیکروبی برای پروبیوتیک‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است زیرا سویه پروبیوتیک باید توانایی سرکوب رشد باکتری‌های بیماری‌زای احتمالی را داشته باشد [۳۲]. اثر ضدمیکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک بیشتر مربوط به متابولیت‌هایی نظیر اسیدهای آلی (عمدتاً اسیدهای لاکتیک، استیک، پروپیونیک، سوربیک و بنزوئیک)، پراکسید هیدروژن، دی‌استیل، اتانول، فنول‌ها و ترکیبات پروتئینی است که در هنگام رشد تولید می‌کنند. علاوه بر این، برخی از سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک قادر به تولید باکتریوسین‌ها هستند که فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی دارند [۳۳]. در شرایط بدن سویه‌های پروبیوتیک با یک مکانیسم حذف رقابتی با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا برای محل‌های اتصال و مواد مغذی رقابت می‌کنند و از تکثیر باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند[۳٤].

اثر ضدمیکروبی *Lev. brevis* KKP 3945 اسیدی و غیراسیدی بر سویه‌های پاتوژن به روش انتشار در آگار به کمک دیسک و چاهک در شکل ۲ نشان داده شده است. در هر دو روش بیشترین اثر بازدارندگی روی *S. aureus* بود که باکتری گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است و اغلب باعث عفونت‌های پوستی می‌شود، اما می‌تواند سبب ذات الریه، عفونت دریچه قلب و عفونت‌های استخوانی شود. کمترین میزان بازدارندگی بر *E. coli* دیده شد که باکتری گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری است و عامل اسهال و مسمومیت‌های غذایی است. وجود باکتریوسین‌ها معمولا از رشد پاتوژن‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کند و در مورد انواع گرم منفی دلیل اصلی ویژگی ضدمیکروبی مربوط به حضور اسیدهای چرب هیدروکسی، اسیدهای آلی و هیدروژن پراکسید می‌باشد. بنابراین در مورد لاکتوباسیلوس‌ها دلیل

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

عمده وجود خاصیت ضدمیکروبی تولید باکتریوسین می‌باشد ولی وجود ترکیباتی مثل هیدروژن پراکسید و اسیدهای آلی، اتانول و رقابت بر سر مواد مغذی نیز بی تاثیر نیست [۳۵].

وسیعی و همکاران (۲۰۱۸)، نشان دادند انتروسین‌های تولید شده توسط انتروکوکوس‌ها نوعی پپتید با بیشترین خاصیت ضدمیکروبی علیه پاتوژن‌های غذایی خصوصا *L. monocytogenes*بوده‌اند [۳۶]. در شرایط بدن سویه‌های پروبیوتیک با یک مکانیسم حذف رقابتی با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا برای محل‌های اتصال و مواد مغذی رقابت می‌کنند و از تکثیر باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند [۱۱]. نتایج فعالیت ضدمیکروبی پژوهش حاضر با مطالعه حجتی و همکاران (۲۰۲۳)، مطابقت داشت.

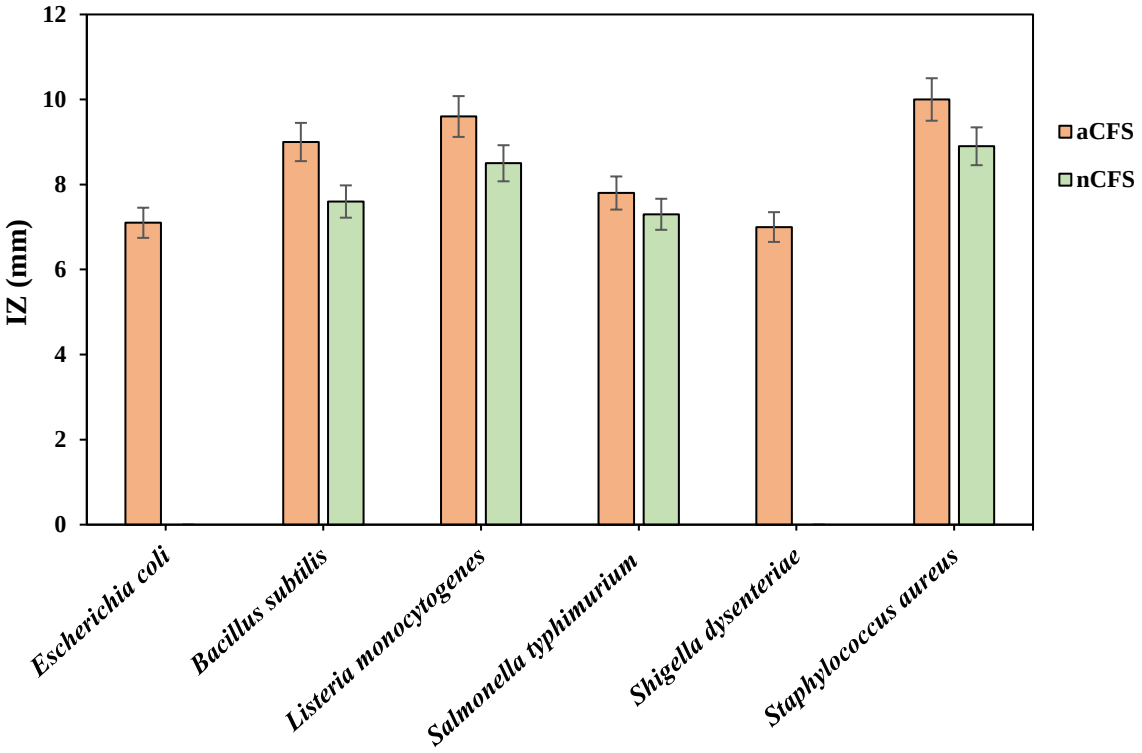

Fig. 3. The antimicrobial potency of *Levilactobacillus brevis* KKP 3945 using well diffusion agar. The abbreviations aCFS and nCFS stand for acid cell-free supernatants and neutralized cell-free supernatants, respectively.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

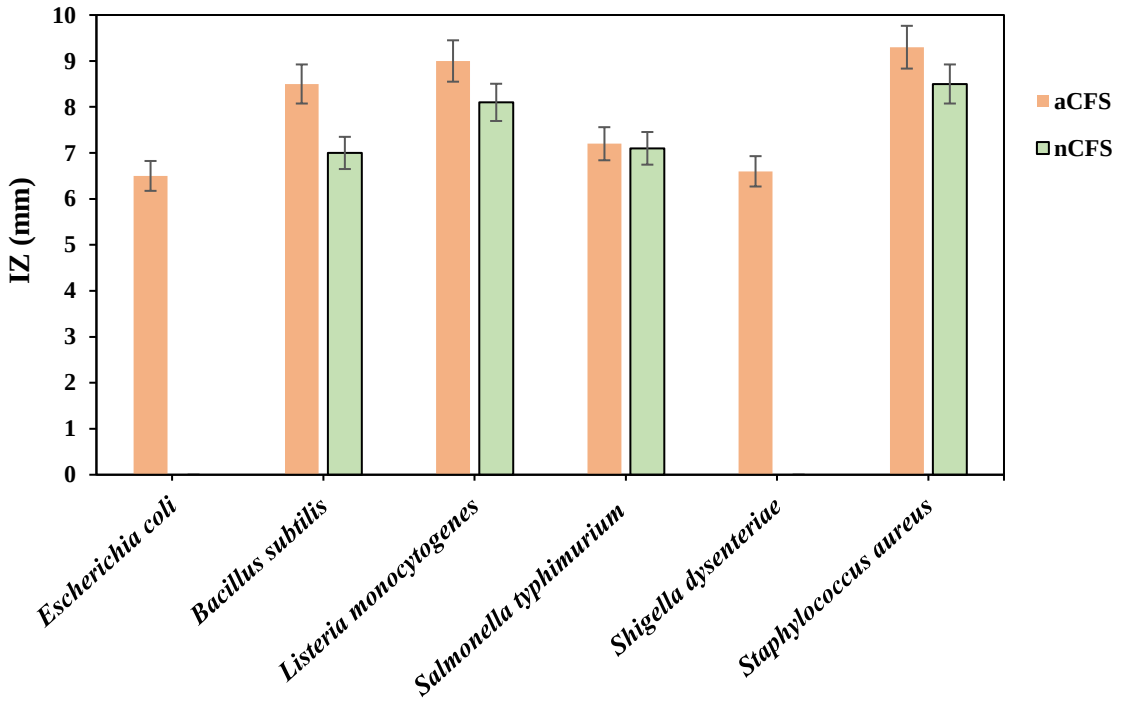

Fig. 4. The antimicrobial potency of *Levilactobacillus brevis* KKP 3945 using disk diffusion agar. The abbreviations aCFS and nCFS stand for acid cell-free supernatants and neutralized cell-free supernatants, respectively.

۳-۹- مقاومت به آنتی‌بیوتیک

مقاومت آنتی‌بیوتیکی با سرعت نگران کننده‌ای در حال توسعه است و به یک نگرانی رو به رشد در زمینه بهداشت عمومی تبدیل شده است. برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک در برابر یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاوم هستند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی ممکن است به‌طور طبیعی اتفاق بیفتد یا توسط مکانیسم‌های ژنتیکی مانند انتقال ژن از طریق پلاسمیدها یا ترانسپوزون‌ها حاصل شود [۱]. در این پژوهش میزان مقامت سویه مورد بررسی نسبت به هشت آنتی‌بیوتیک بالینی مورد بررسی قرار گرفت. جدول ۲، میزان مقاومت سویه *Lev. brevis* KKP 3945 را نسبت آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نشان می‌دهد.

مکانیسم اثر آنتی‌بیوتیک‌ها بر نابودی میکروارگانیسم‌ها متفاوت است. برخی آنتی‌بیوتیک‌ها مثل استرپتومایسین، کلرومفنیکول، تتراسایکلین، اریترومایسین از سنتز پروتئین و برخی دیگر مثل ریفامپیسین و کوتریماکسازول، از ساخت mRNA جلوگیری میکنند وبرخی مانند آمپیسیلین، ونکومایسین و پنیسیلین جی، دیواره سلولی باکتری را تخریب می‌کنند. آنتی بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مانند پنی‌سیلین و سفالوسپورین نفوذپذیری سلول راتحت تاثیر قرار داده و منجر به تخریب دیواره می‌شوند [۳۷]. بر اساس پژوهش‌های موجود گونه‌های لاکتوباسیلوس معمولاً به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند اریترومایسین، کلرامفنیکل و تتراسایکلین حساس هستند [۳۸]. حساسیت قابل توجه سویه جدا شده به آنتی بیوتیک‌های متعدد نشان می‌دهد که ممکن است این سویه، حامل ژن‌هایی که مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجاد می‌کند و به طور بالقوه می‌تواند آن را به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا منتقل کند نباشد. در پژوهش علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۳)، *Lev. brevis* HL6 تقریباً به تمام آنتی بیوتیک‌ها حساس بود و بیشترین و کمترین حساسیت به ترتیب برای نیتروفورانتوئین (IZ = ۲۶ میلی‌متر) و آمپی سیلین (IZ = ۱۰/۵۰ میلی‌متر) یافت

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

شد[۱۶]. حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های اسید لاکتیک، که یک ویژگی پروبیوتیک است، و سطح مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند در بین سویه‌های مختلف و حتی در زیر گونه‌ها متفاوت باشد [۳۸]. 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 2. Effect of common therapeutic antibiotics on *Levilactobacillus brevis* KKP 3945

Antibiotic	*L. brevis* KKP3945
Vancomycin	**Intermediate**
Gentamicin	**Sensitive**
Chloramphenicol	**Intermediate**
Nitrofurazone	**Sensitive**
Nalidixic	**Sensitive**
Penicillin	**Sensitive**
Imipenem	**Resistant**
Ciprofloxacin	**Sensitive**

٤- نتیجه‌گیری

غذاهای تخمیری سنتی بر پایه لبنیات، منابع غنی از فلور لاکتیکی بومی هستند. سویه‌های بومی باکتری‌های اسیدلاکتیک اهمیت ویژه‌ای در صنایع لبنی یافته‌اند چرا که شناسایی و بررسی ویژگی‌های تکنولوژیکی این باکتری‌ها میتواند امکان استفاده‌های صنعتی آن‌ها را فراهم آورد. در این پژوهش *Lev. brevis* KKP 3945 جداسازی شده ماست محلی، از نظر خواص پروبیوتیکی و ضدمیکروبی مورد ارزیابی قرار گرفت. این سویه توانایی تحمل pHهای پایین و غلظت‌های مختلف نمک صفراوی را داشت. این باکتری قابلیت خوبی در مهار باکتری‌های بیماری‌زا از خود نشان داد. *Lev. brevis* KKP 3945 نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی دارای حساسیت بود و از این رو نگرانی از جهت انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به باکتری‌های بیماری‌زا وجود ندارد. به طور کلی نتایج نشان داد که این سویه دارای پتانسیل پروبیوتیکی و ضدمیکروبی مورد قبولی است و می‌تواند برای مصارف انسانی مورد استفاده قرار گیرد. در ادامه لازم است آزمون‌های بیشتری در شرایط برون تنی و درون تنی شامل چسبیدن به سلول‌های اپیتلیال روده، تولید باکتریوسین، بررسی اثر سویه بر سطح قند خون در مدل حیوانی و غیره نیز انجام گردد تا بتوان از این باکتری به‌عنوان یک پروبیوتیک و یک نگهدارنده طبیعی در تولید فرآورده‌های غذایی فراسودمند استفاده نمود.

٥- تقدیر و تشکر

نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت مالی طرح پژوهشی به شماره ۱۴۰۲/٤٤ که این مقاله مستخرج از آن می‌باشد، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

٥- منابع

[1] 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.

[2] Tabatabai Yazdi F, Ehaghi A, Alizadeh Behbahani B, and Mortazavi S.A. (2014). Investigating the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

from kimchi produced in Iran. Journal of Qom University of Medical Sciences, 9(5), 11-22. SID. https://sid.ir/paper/132345/fa

[3] Tabatabai Yazdi F, vaseei A, AliZadeh Behbahani B, Mortazavi S.A.2015. Diversity of lactic acid bacteria isolated from yellow zabol kashk using 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *FSCT* 0; 13 (59) :25-36.

[4] Alizadeh Behbahani B, and Naushad M. (2021). Isolation and identification of lactobacillus strains from local Behbahan cheese and investigation of their technological and antimicrobial properties against food pathogens. Journal of Nutrition Sciences and Food Industries of Iran, 16(1), 133-142. SID. https://sid.ir/paper/961740/fa

[5] Yousefi M, Zadbari M. R, Alizadeh Khaled Abad M, Khashi R.2012.Antagonistic effect of antibacteria compounds produced from isolated Lactobacilli strains from urn cheeses of west Azarbaijan. Res Food Industry. 2012; 22 (2): 123-130. [In Persian

[6] Hojjati M, Alizadeh Behbahani B, Fallah F.2021. Investigating the technological and antimicrobial properties of *Lactobacillus brevis gp104* strain isolated from Khiki cheese. Applied microbiology in food industry Journal. Issue 7, Number 3, Pages: 14-26

[7] Rokhtabnak, A, Khaleghi, M, Sasan H.A. 2015. Isolation and identification of Lactobacillus bacteria with probiotic potential from traditional dairy in Kerman. Iran Journal Med Microbial: Volume 10, Number 1 (March-April).

[8] Karnama P, Pakdin Parizi A, Nasr Sh. 2019. Isolation, identification and description of lactic acid bacteria from traditional dairy products of Mazandaran province. *T*he second international congress and the 25th national congress of science and engineering of food industry of Iran, Mazandaran.

[9] 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.

[10] 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.

[11] Momenzadeh S, Joyandeh H, Alizadeh Behbahani B, Barzegar H.2021. evaluation of probiotic and antibacterial properties of Lactobacillus fermentum SL163. Iranian Food Science and Technology Research Journal. Vol. 17, No. 2, June. July. 2021, p. 233- 242.

[12] Anisimova E.A, & Yarullina D.R. 2019. Antibiotic Resistance of Lactobacillus Strains. Current Microbiology, 76(12):1407-1416.

[13] Shahrampour D, Khamiri M, Razavi S.M.A, Keshiri M. 2018. Investigating the effect of racial diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different foods. Their antimicrobial, antioxidant and cumulative activity. Journal of Nutritional Sciences and Food Industries of Iran14th year, no 2, 2018, pages 39-53

[14] Alizadeh Behbahani B, Noshad M.2021. Isolation and Identification of Lactobacillus Strains from Behbahan Local Cheeses and Investigation of Technological and Antimicrobial Properties of These Strains against Major Food Pathogens. Iranian Journal Nutr Sci Food Technol 2021; 16 (1) :133-142.

[15] Noshad M, Alizadeh Behbahani B, Hojjati M.2021. Investigation of probiotic and technological characteristics of lactic acid bacteria isolated from native Doogh of Behbahan. Journal of Food Industry Research. Volume 31, Number 4.2021.

[16] Alizadeh Behbahani B, Jooyandeh H, Hojjati M, Ghodsi Sheikhjan M.2023.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

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.

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

[18] 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/s12602-023-10125-y.

[19] Hyronimus B, Le Marrec C, Sassi A.H, Deschamps A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. International journal of food microbiology. 2000 Nov 1;61(2-3):193-7.

[20] Alizadeh Behbahani B, Jooyandeh H, Falah, F, & Vasiee, A. 2020. Gammaaminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* A3: Optimization of production, antioxidant potential, cell toxicity, and antimicrobial activity. *Food Sciences and Nutrition*, 8(10), 5330–5339. https://doi.org/10.1002/fsn3.1838.

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

[22] 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.

[23] 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, Article 696267.

[24] Yadav R, Khan S. H, Mada S. B, Meena S, Kapila R, and Kapila S. (2019). Consumption of Probiotic Lactobacillus fermentum MTCC: 5898-fermented milk attenuates dyslipidemia, oxidative stress, and inflammation in male rats fed on cholesterol-enriched diet, Probiotics Antimicrob. Proteins, 11, 509e518 (2019).

[25] 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.

[26] Tok E & Aslim B. (2010). Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. Microbiology and Immunology, 54, 257–264.

[27] Nami Y, Vaseghi Bakhshayesh R, Mohammadzadeh Jalaly H, Lotfi H, Eslami S, Hejazi MA. (2019). Probiotic properties of Enterococcus isolated from artisanal dairy products. Frontiers in microbiology. 10:300.

[28] 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.

[29] Baumgartner A, Kueffer M, Simmen A & Grand M. 1998. Relatedness of Lactobacillus rhamnosusStrains isolated from clinical specimens and such from food-stuffs, humans and Technology. LWT - Food Science and Technology, 31,489–494.

[30] Yang J, Wang J, Yang K, Liu M, Qi Y, Zhang T & Wei X. 2018, Antibacterial activity of selenium-enriched lactic acid bacteria against common food-borne pathogens in vitro. Journal of Dairy Science, 101(3), 1930-1942.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

[31] Cui X, Shi Y, Gu S, Yan X, Chen H & Ge J. 2018. Antibacterial and antibiofilm activity of lactic acid bacteria isolated from traditional artisanal milk cheese from Northeast China against enteropathogenic bacteria. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 10(4), 601-610.

[32] Mallappa R. H, Singh D. K, Rokana N, Pradhan D, Batish V. K & Grover S. 2019. Screening and selection of probiotic Lactobacillus strains of Indian gut origin based on assessment of desired probiotic attributes combined with principal component and heatmap analysis. LWT-Food Science and Technology, 105, 272-281.

[33] Yang J, Wang J, Yang K, Liu M, Qi Y, Zhang T & Wei, X. 2018. Antibacterial activity of selenium-enriched lactic acid bacteria against common food-borne pathogens in vitro. Journal of Dairy Science, 101(3), 1930-1942.

[34] Cui X, Shi Y, Gu S, Yan X, Chen H & Ge J. 2018. Antibacterial and antibiofilm activity of lactic acid bacteria isolated from traditional artisanal milk cheese from Northeast China against enteropathogenic bacteria. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 10(4), 601-610.

[35] Georgieva R, Yocheva L, Tserovska L, Zhelezova G, Stefanova N, Atanasova A, Danguleva A, Ivanova G, Karapetkov N, Rumyan N, Karaivanova E. 2015. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of Lactobacillus and Bifidobacterium spp. intended for use as starter and probiotic cultures. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2015 Jan 2;29(1):84-91.

[36] Vasiee A, Alizadeh Behbahani B, Yazdi F, Mortazavi SA, Noorbakhsh H.2018. 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.

[37] 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.

[38] 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Evaluation of probiotic and antimicrobial properties of *Levilactobacillus brevis* KKP 3945 Isolated from Local Yogurt

Behrooz Alizadeh Behbahani*[1], Mohammad Hojati[2], Bahareh Goudarzi Shams Abadi[3]

1-Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

2-Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

3- PhD Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received:2024/2/12
Accepted:2024/4/22

Keywords:

Levilactobacillus brevis,

Antimicrobial activity,

Resistance to acid,

Resistance to bile salts.

DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82.

*Corresponding Author E-
B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

ABSTRACT

This research was conducted to investigate the probiotic potential of the strain *Levilactobacillus brevis* KKP 3945 isolated from local yogurt. Initially, the strain was evaluated for probiotic characteristics such as acid resistance (pH 2, 3, and 4), hydrophobicity, bile resistance (0.3%, 0.5%, and 0.7%), antioxidant activity (DPPH and ABTS), and cholesterol assimilation. The antimicrobial activity of the strain against six indicator foodborne pathogens (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Shigella dysenteriae*) was assessed using disk diffusion agar and well diffusion agar methods. The ability to produce biogenic amines, absence of hemolytic and DNase activity was also evaluated. According to the results, based on the results, Growth of the strain was inhibited at a bile salt concentration of 0.5%. A significant decrease in the number of viable cells was observed when the pH was reduced from 4 to 2, decreasing from 9.30 to 8.78 Log CFU/mL. Additionally, the number of viable cells of the strain at pH 4 decreased from 9.30 to 8.25 Log CFU/mL with an increase in time from 0 to 3 hours. The highest inhibitory effect of the strain was observed against *S. aureus*, while the lowest inhibition was observed against *E. coli*. The strain showed negative results for hemolytic and DNase activity, and its ability to reduce cholesterol levels was determined to be 44.44 ± 0.6%. The percentage of free radical inhibition in the DPPH and ABTS methods was 48.3% and 50.5%, respectively. *Lev. brevis* KKP 3945 was found to be sensitive to antibiotics such as nitrofurazone, nalidixic acid, penicillin, and ciprofloxacin. The results indicated that *Lev. brevis* KKP 3945 possessed acceptable probiotic characteristics and could be utilized as a probiotic bacterium in food products.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-06]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.157.82]