مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از پنیر لیقوان

مهدی حسین‌زاده[۱]، صمد وجدی حکم آباد[۲] و جلیل خندقی[۳و٤*]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی ، سراب، ایران.

۲. استادیار گروه علوم دامی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران.

۳. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران.

۴. گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت:۱٤۰۳/۳/۳

تاریخ پذیرش: ۱٤۰۳/۹/٤

کلمات کلیدی:

پروبیوتیک،

پنیر لیقوان،

لاکتوباسیلوس،

انتروکوکوس

DOI:10.22034/FSCT.22.158.270.

* مسئول مکاتبات:

khandaghi@iausa.ac.ir

چکیده

عامل اصلی حضور میکرفلور خاص مانند باکتری‌های لاکتیک اسید در محصولات لبنی تهیه شده از شیر خام مانند پنیر لیقوان، روش‌های سنتی آماده‌سازی این محصولات است. تعداد زیادی از این باکتری‌ها میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بوده و بعنوان مثال گونه‌های بسیاری از باکتری‌های لاکتوباسیلوس، انتروکوکوس و پدیوکوکوس که در غذاها یافت شده‌اند، ویژگی پروبیوتیکی نشان داده‌اند. در تحقیق حاضر پس از جداسازی فنوتیپی باکتری‌های لاکتیک اسید از ۲۵ نمونه پنیر سنتی لیقوان، جدایه‌ها با استفاده آزمون PCR اختصاصی جنس‌های لاکتوباسیلوس، انتروکوکوس و پدیوکوکوس تایید شدند. سپس ویژگی‌های پروبیوتیکی شامل مقاومت به شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش انسان، خواص ضدمیکروبی، خاصیت خودتجمعی و تجمع مشترک، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و قدرت همولیزکنندگی سویه‌های منتخب مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس آزمون‌های تشخیص بیوشیمیایی و مولکولی، از بین ۸٤ سویه‌ی منتخب، تعداد ۵۸ جدایه به‌عنوان لاکتوباسیلوس (۲۹ جدایه)، انتروکوکوس (۱۸ جدایه) و پدیوکوکوس (۱۱ جدایه) شناسایی شدند. غربال‌گری این جدایه‌ها برای زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش انسان نشان داد که ۲٦/۱ درصد جدایه‌ها (۱٤ جدایه) مقاومت بالای ۵۰ درصد داشتند. همچنین، تعداد نه جدایه از سویه‌های منتخب اثر ضدمیکروبی قوی روی *لیستریا مونوسایتوجنز* و *استافیلوکوکوس ارئوس* و همچنین کپک‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم* نشان دادند. به‌علاوه، بر اساس قابلیت خودتجمعی و تجمع مشترک، تعداد چهار جدایه‌ی LS106، LS71، LS33 و LS6 (متعلق به دو جنس لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس) انتخاب شدند. در نهایت، بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی حاکی از حساسیت این جدایه‌ها به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های به‌کار رفته بود بطوریکه تمام جدایه‌ها نسبت به تتراسایکلین و آمپی‌سیلین حساس بودند. همچنین خاصیت همولیتیکی در هیچ‌یک از این چهار جدایه مشاهده نشد. بنابراین، این جدایه‌ها به‌عنوان گزینه‌های مناسب برای استفاده در محصولات غذایی تخمیری و بهره‌گیری از خواص سودمند آن‌ها معرفی می‌شوند.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.270]

۱-مقدمه

مصرف محصولات لبنی تخمیری به علت وجود فلور میکروبی مفید در آن و متابولیت‌های آن‌ها، نقش به‌سزایی در سلامت مصرف کنندگان دارد. روش‌های سنتی جهت آماده‌سازی محصولات لبنی تهیه شده از شیر خام دام‌های مختلف مانند گاو و بز و گوسفند عامل حضور میکروبیوتای خاص در این محصولات است که معمولا از دسته باکتری‌های لاکتیک اسید هستند [۱]. تحقیقات نشان داده است که این باکتری‌های مفید به‌واسطه متابولیت‌هایی مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و پپتیدهای فعال زیستی مانند باکتریوسین‌ها و ترکیبات شبه باکتریوسینی، می‌توانند به صنعت غذا در تولید فرآورده‌های سلامت محور کمک به‌سزایی بکنند [۲]. پنیر به عنوان یک عضو مهم خانواده لبنیات، منبع خوبی برای پروتئین، کلسیم و فسفر محسوب می‌شود. آنچه سبب بوجود آمدن انواع پنیرها شده است روش‌های متنوع تولید آن یعنی دلمه کردن، آبگیری و رساندن پنیر می‌باشد [۳]. یکی از محصولات لبنی تخمیری سنتی ایران، پنیر لیقوان است که نوعی پنیر بدون استارتر و نیمه سفت است که به‌طور سنتی از مخلوط شیر میش، بز در روستای لیقوان در تبریز تهیه می‌شود. میزان تولید پنیر در منطقه لیقوان سالانه بیش از ۳۱۵۰ تن است و این پنیر به دلیل طعم خاص آن، پرطرفدارترین نوع پنیرهای سنتی ایران است. مهم‌ترین وجه تمایز پنیر لیقوان با سایر محصولات مشابه، استفاده از شیر خام بدون افزودن کشت استارتر در فرمولاسیون آن است [٤].

باکتری‌های اسیدلاکتیک[1] یا LAB گروه هتروژنی از کوکسی‌ها یا باسیل‌های گرم مثبت و بدون اسپور هستند که بر پایه ویژگی‌های ریخت‌شناسی، متابولیک و فیزیولوژیک در یک گروه قرار گرفته‌اند. متابولیت اصلی تولید شده توسط آن‌ها، اسیدلاکتیک حاصل از تخمیر کربوهیدرات‌ها است [٥]. این باکتری‌ها دارای کاربرد بسیار زیادی در صنعت غذا می‌باشند به طوریکه تخمیر لاکتیکی علاوه بر افزایش زمان ماندگاری، باعث بهبود خواص ارگانولپتیک غذاها نیز می‌شود [٦]. همچنین باکتری‌های اسید لاکتیک اصلی‌ترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بوده و گونه‌های بسیاری از باکتری‌های لاکتوباسیلوس، انتروکوکوس، لوکونوستوک و پدیوکوکوس که در غذاها یافت شده‌اند، ویژگی پروبیوتیکی از خود نشان دادند [۷].

به دلیل اهمیت فراوان این باکتری‌ها، جداسازی و شناسایی گونه‌های جدید این باکتری‌ها از منابع مختلف غذایی از اهمیت زیادی برخوردار است. عموما شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک بر اساس ویژگی‌های مختلف فنوتیپیکی (ریخت‌شناسی سلول، شرایط رشد و الگوی تخمیر کربوهیدرات‌ها) انجام می‌شود [۸] ولی این روش‌ها بخصوص در تمایز سویه‌های باکتری‌های LAB نتایج طبقه‌بندی واضحی را ارائه نمی‌کنند. بنابراین تشخیص به‌کمک روش‌های مولکولی مانند توالی‌یابی ژن‌های 16/23 S rRNA و یا آزمون‌های PCR اختصاصی جنس و گونه[2] به عنوان ابزار موثری برای شناسایی این گروه از باکتری‌ها در مواد غذایی تخمیری انجام می‌شود [۹] به‌طوریکه، مطالعات بسیاری در زمینه کاربرد روش‌های مولکولی برای شناسایی جدایه‌های LAB از غذاهای مختلف انجام شده است [۱, ۱۰]

از ویژگی‌های سودمند پروبیوتیک‌ها می‌توان به افزایش فراهمی زیستی مواد مغذی، اصلاح و تعدیل فلور میکروبی دستگاه گوارش، اثرات ضدمیکروبی برعلیه باکتری‌های بیماری‌زا، کاهش سطح کلسترول سرم خون و جلوگیری از سرطان [۱۱] اشاره کرد. پروبیوتیک‌ها برای اعمال اثرات خود، باید در برابر pH پایین و نمک‌های صفراوی مقاومت داشته باشند تا در دستگاه گوارش فوقانی زنده بمانند و سپس با چسبندگی به سلول های اپیتلیال روده کلونیزه شوند [۱۲]. سایر ویژگی‌های پروبیوتیکی ضروری این میکروارگانیسم‌ها، بی‌خطر بودن آن‌ها برای مصرف کننده است که عدم مقاومت

1 -Lactic acid bacteria

2 -Genus/Species -specific PCR

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.270]

دارویی به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی از مهم‌ترین آن‌ها است [۱۳].

اگرچه در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی بر روی جدایه‌های پروبیوتیک غذاهای تخمیری سنتی ایرانی انجام شده است [۱٤, ۱۵]، جستجو برای یافتن سویه‌های موثر دیگر هنوز هم ادامه دارد چرا که در مناطق مختلف میکروفلور این محصولات با توجه به شرایط فصلی و دیگر عوامل محیطی می‌تواند متغییر باشد [۱٦]. این موضوع تلاش برای یافتن جدایه‌های وحشی با توان پروبیوتیک در محصولات تخمیری هر منطقه جغرافیایی را توجیه می‌نماید. با توجه به مطالب ذکر شده، جداسازی و بررسی جمعیت باکتری‌های لاکتیک اسید از پنیر سنتی لیقوان و شناسایی خواص پروبیوتیکی و جنبه‌های ایمنی این جدایه‌ها مهمترین اهداف پژوهش حاضر را تشکیل می‌دهد.

۲- روش کار

۲-۱- نمونه‌برداری

این مطالعه در زمستان سال ۱٤۰۲ و به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های لاکتیک اسید از پنیر سنتی لیقوان انجام گرفت. برای این کار، تعداد ۲۵ نمونه پنیر سنتی لیقوان به‌صورت تصادفی از محل‌های تولید در منطقه لیقوان تبریز برداشت شده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه واقع در تبریز منتقل شدند.

۲-۲- جداسازی باکترهای لاکتیک اسید

برای جداسازی اولیه باکتری‌های لاکتیک اسید، از خصوصیات فنوتیپیکی آن‌ها استفاده شد [۱۷, ۱۸]. برای این منظور مقدار یک گرم از نمونه پنیر به ۹ میلی‌لیتر محلول استریل سرم فیزیولوژی اضافه شده و پس از تهیه رقت‌های متوالی ده برابر، نمونه‌ها در سطح محیط کشت MRS آگار کشت شدند. به‌منظور ایجاد شرایط رشد بهینه باکتری‌های مزوفیل و ترموفیل، پلیت‌ها ۲٤-۷۲ ساعت در شرایط بیهوازی و در دو دمای ۳۰ و ٤۲ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شدند. تعداد پنج پرگنه با ریخت‌شناسی متفاوت از هر پلیت انتخاب و پس از تایید گرم مثبت و کاتالاز منفی بودن جدایه‌ها، تفکیک گروه‌های فنوتیپی به شکل زیر انجام شد.

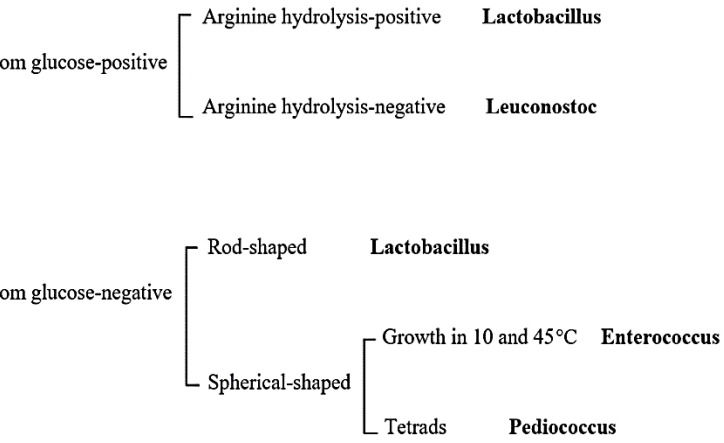

Figure1. Differentiation scheme for lactic acid bacteria isolated from Lighvan cheese

۲-۳- تایید تشخیص به‌روش مولکولی

شناسایی مولکولی جدایه‌ها پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج (Pouya Gene Azma-PD115-50 , Iran) انجام گرفت. برای این منظور واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر DNAالگو، ۰/٤ میکرومولار از هر آغازگر اختصاصی جنس، ۰/۲ میکرومولار dNTP ، ۲ میکرومولار $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase در دستگاه ترموسایکلر (PTC 200 Waltham, USA) انجام گرفت. سیکل‌های حرارتی بکار رفته برای همه آغازگرها شامل پنج دقیقه واسرشت سازی (Denaturation) اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و هفت دقیقه دمای ۷۲ درجه سلسیوس در پایان چرخه‌ی حرارتی بود. برای آغازگر مختص جنس پدیوکوکوس ۳۰ چرخه حرارتی شامل واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، اتصال آغازگرها (Annealing) در دمای ٦۱ درجه به مدت ۵۰ ثانیه و توسعه آغازگر (Elongation) در دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه انجام گرفت. برای آغازگرهای مختص جنس لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس ۳۰ چرخه حرارتی بصورت Touchdown شامل واسرشت سازی در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.270]

دمای ۹۵ درجه به مدت ٤۵ ثانیه، ۵۰ ثانیه برای اتصال آغازگرها از دمای ۵۹ تا ۵٦ درجه برای آغازگر مختص جنس انتروکوکوس و ۵۰ ثانیه برای اتصال آغازگرها از دمای ۵۹ تا ۵۲ درجه برای آغازگر مختص جنس لاکتوباسیلوس و سپس توسعه آغازگرها در دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه انجام گرفت. توالی آغازگرهای بکار رفته در این مطالعه در جدول۱ آورده شده است. محصولPCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم برماید الکتروفورز شد (Bio-Rad, USA).

Table1. Genus-specific primers used for the detection of LAB isolates from Lighvan cheese

Primers	Primers Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
Lactobacillus genus-specific primers			
LbLMA1-rev	F: CTCAAAACTAAACAAAGTTTC	209	[۱۹]
R16-1	R: CTTGTACACACCGCCCGTCA		
Enterococcus genus-specific primers			
Ent1	F: TACTGACAAACCATTCATGATG	112	[۲۰]
Ent2	R: AACTTCGTCACCAACGCGAAC		
Pediococcus genus-specific primers			
Pedio_F	F: GAACTCGTGTACGTTGAAAAGTGCTGA	701	[۲۱]
Pedio_R	R: AGTGGAACTCCATGTGTAG		

۲-٤- بررسی خواص پروبیوتیکی

۲-٤-۱- مقاومت به شرایط معادل دستگاه گوارش انسان

برای ارزیابی زنده‌مانی ایزوله‌های LAB در محیط مشابه معده‌ی انسان، بررسی تحمل هم‌زمان سویه‌ها به اسید و پپسین (pH سوسپانسیون میکروبی به ۲/۵ رسانده شده و مقدار ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به آن پپسین اضافه شد) انجام شد. پس از یک و سه ساعت انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه (با توجه مدت زمان طبیعی توقف غذا در محیط معده در انسان)، آن‌ها در محیط MRS agar کشت سطحی شده و تعداد باکتری‌های زنده مانده گزارش گردید (۲۲). همچنین مقاومت جدایه‌ها به شرایط معادل روده کوچک با تلقیح رسوبات سلولی کشت تازه جدایه‌های LAB در MRS broth حاوی ۰/۳ درصد صفرا (*w/v*) و یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر پانکراتین (pH =۸) انجام شد. پس از دو و چهار ساعت انکوباسیون آن‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس (با توجه مدت زمان طبیعی توقف غذا در روده در انسان)، باکتری‌های زنده مانده شمارش شد [۲۲] و در نهایت از باکتری‌های منتخب که مقاومت بالاتری به اسید و صفرا از خود نشان دادند برای ادامه کار استفاده گردید.

۲-٤-۲- اثرات ضدمیکروبی

روش انتشار در چاهک برای تعیین فعالیت ضد باکتریایی ایزوله‌های LAB منتخب بر روی باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت *لیستریا مونوسایتوجنز* و *استافیلوکوکوس ارئوس* و دو باکتری شاخص گرم منفی *اشرشیاکلی* و *سالمونلا انتریکا* استفاده شد [۱۰]. ابتدا باکتری‌های بیماری‌زای شاخص در سطح محیط MRS agar کشت و پس از ۲٤ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، چاهک‌های با قطر ۵ میلی‌متر در این پلیت‌ها ایجاد شده و ۵۰ میکرولیتر از فیلتر شده‌ی (از طریق فیلتر ۰/۲ میکرومتر) کشت تازه لاکتیک اسید باکتری‌های منتخب به هر چاهک اضافه شد. به این منظور فرم خنثی شده فیلتر شده‌ها (pH =۷/۲) که با آنزیم کاتالاز تیمار شده است استفاده گردید. پس از انکوباسیون یک شبه پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، مناطق عدم رشد دارای قطر بالاتر از ۱۰ میلی‌متر به‌عنوان اثر ضدمیکروبی قوی در نظر گرفته شد.

برای بررسی فعالیت ضد قارچی نیز کپک‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم* استفاده شد (Wang et al., 2012). برای این کار محیط کشت PDA [۳] حاوی غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ درصد (*v/v*) از سوسپانسیون‌های

3- Potato Dextrose Agar

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.270]

فیلترشده جدایه‌های لاکتیک اسید باکتری تهیه و پس از جامد شدن محیط کشت تکه‌ای با قطر حدود ۵ میلی‌متر از کلنی تازه کپک شاخص (با جدا کردن قطعه قارچی از محیط خارجی پرگنه کپک رشد کرده در پلیت) در مرکز آن تلقیح شد. پلیت‌ها تا یک هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شده و حداقل غلظت بازدارنده از رشد[4] هر کپک بدست آمد. سپس رشد کلنی کپک (میانگین دو قطر عمود بر هم) در پلیت‌های تیمار شده (T) و شاهد (C) اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی از رشد (I) در این غلظت بصورت زیر محاسبه گردید [۲۳].

$$I\ (\%) = [(C-T)/C] \times 100$$

۲-٤-۳- خاصیت خود تجمعی[5] و تجمع مشترک[6]

این دو ویژگی به‌روش اسپکتروفوتومتری تعیین شده است [۲٤]. پس از گرم‌خانه گذاری جدایه‌های LAB در محیط MRS broth (۲٤ ساعت، ۳۷ درجه سلسیوس) و تهیه سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل نیم مک‌فارلند، رسوب سلول‌ها با دو بار سانتریفیوژ کردن در دستگاه سانتریفیوژ بهسان مدل MC10 (۵ دقیقه، ٤ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه) جدا و پس از شسته شدن، مجددا در همان حجم فسفات بافر وارد شد. سپس مخلوط حاصل ورتکس شده و مدت ٤ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس به‌حالت سکون قرار داده شد. درصد خاصیت تجمعی با استفاده از رابطه زیر بدست آمد.

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

A_F و A_0 به ترتیب جذب نوری پایانی و اولیه سوسپانسیون جدایه‌های LAB می‌باشد که در طول موج ٦۲۰ نانومتر اسپکتروفوتومتر (Cecil-aquarius, UK) اندازه‌گیری شده است.

برای بررسی خاصیت تجمع مشترک نیز پس از تهیه سوسپانسیون‌های میکروبی به روش اشاره شده، حجم‌های مساوی از هر سوسپانسیون جدایه‌ی LAB با هر کدام از باکتری‌های بیماری‌زای *اشریشیا کولی* و *سالمونلا انتریکا* مخلوط و پس از ورتکس شدن، ٤ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس به‌حالت سکون قرار گرفت و در پایان، خاصیت تجمع مشترک مطابق رابطه زیر محاسبه شد.

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

A_P، A_L و A_{mix} به ترتیب جذب نوری سوسپانسیون باکتری‌های بیماری‌زا، جدایه‌های LAB و مخلوط آن‌ها پس از ٤ ساعت انکوباسیون در طول موج ٦۲۰ نانومتر می‌باشد.

۲-٤-٤- مقاومت آنتی‌بیوتیکی

حساسیت لاکتیک اسید باکتری‌های منتخب به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی با استفاده از روش انتشار دیسک[7] انجام گرفت [۲۵]. برای این منظور، پس از تهیه کشت چمنی از سوسپانسیون کشت تازه جدایه‌های LAB (معادل با استاندارد نیم مک‌فارلند) روی محیط کشت MRS agar ، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شامل ونکومایسین (۳۰µg)، سفیگزیم (۵µg)، پنی‌سیلین (۱۰ واحد)، کلیندامایسین (۲µg)، تتراسایکلین (۳۰µg)، کلرامفنیکل (۳۰µg)، آمپی‌سیلین (۱۰µg)، اریترومایسین (۵µg)، آزیترومایسین (۱۵µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، سفتریاکسون (۳۰µg) تهیه شده از شرکت پادتن طب ایران، با فواصل مناسب روی محیط کشت قرار داده شد. میانگین دو قطر عمود بر هم هاله عدم رشد شکل گرفته پس از ۲٤ ساعت گرم‌خانه‌گذاری پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس ثبت گردید.

۲-٤-۵- خاصیت همولیتیکی

به منظور ارزیابی قدرت همولیز کنندگی، جدایه‌های LAB در محیط کشت آگار خون‌دار حاوی ۵ درصد خون گوسفند، کشت و گرم‌خانه گذاری شدند (٤۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس). تشکیل هاله همولیز شفاف و یا تغییر رنگ سبز رنگ در اطراف پرگنه‌ها به ترتیب به‌عنوان همولیز بتا و آلفا در نظر گرفته شد [۲٦].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- جداسازی باکتری‌های لاکتیک اسید

4- Minimum inhibitory concentration
5 -Auto-aggregation
6- Co-aggregation
7 -Disk Diffusion Method

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.270]

از مجموع ۱۲۵ پرگنه‌ی سفید تا خاکستری جداسازی و خالص‌سازی شده از پلیت‌های مختلف محیط کشت MRS agar ، ۸٤ جدایه (٦۷/۲ درصد) پس از انجام آزمون‌های فنوتیپی به‌عنوان لاکتوباسیلوس (۳۹ جدایه)، انتروکوکوس (۲۵ جدایه) و پدیوکوکوس (۲۰ جدایه) انتخاب و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر یک از جنس‌های باکتریایی مذکور توسط آزمایش PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. در پایان، تعداد ۵۸ جدایه به‌عنوان لاکتوباسیلوس (۲۹ جدایه)، انتروکوکوس (۱۸ جدایه)، پدیوکوکوس (۱۱ جدایه) تایید شدند. شکل۱ یکی از تصاویر ژل‌آگارز مربوط به تایید مولکولی جدایه‌های LAB نمونه‌های پنیر لیقوان را نشان می‌دهد.

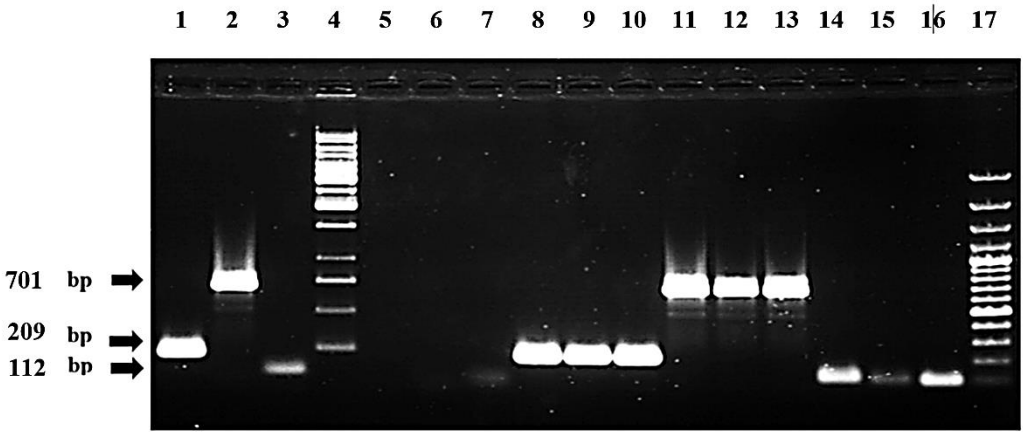

Figure2. Image of the 1.5% gel agarose (Invitrogen, G501802) of PCR products of Lighvan cheese isolates using genus-specific primers for Lactobacillus, Enterococcus and Pediococcus genera described in Table1. Lane 4: 1Kbp marker (Sinaclon SL 7051, Iran); Lane 17: 100bp marker (Sinaclon SL 7031, Iran); Lanes 1-3: positive control for *Lactobacillus plantarum* (PTCC 1058), *Pediococcus pentosaceus* (ATCC 25744) and *Enterococcus faecalis* (PTCC 1237); Lane 5-7: negative control (without template DNA); Lanes 8–16: DNA samples isolated from Lighvan cheese.

باکتری‌های اسید لاکتیک نقش اصلی را در رسیدن و تهیه انواع غذاهای تخمیری دارند و بنابراین به‌کارگیری چنین باکتری‌هایی که خاصیت پروبیوتیکی نیز از خود نشان دهند، در فراورده‌های غذایی به‌منظور بهبود سلامت مصرف کنندگان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۲۷]. از طرفی باکتری‌های پروبیوتیک موجود در محصولات تخمیری سنتی و بومی هر منطقه‌ای به دلیل سازگاری بیشتر با محیط، مورد توجه بیشتری هستند [۲۸] و بر همین اساس، مطالعات زیادی برای شناسایی و معرفی جمعیت باکتری‌های LAB غذاهای متنوع سنتی ایرانی و ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی آن‌ها انجام شده است [۵, ۲۹]. در همین راستا، در گذشته نیز گونه‌های مختلف جنس لاکتوباسیلوس [۳۰]، انتروکوکوس [۱۰] و پدیوکوکوس [۳۱] با خواص پروبیوتیکی از غذاهای تخمیری ایرانی جدا شده است.

۳-۲- خواص پروبیوتیکی جدایه‌ها

۳-۲-۱- مقاومت به شرایط معادل دستگاه گوارش انسان

در جدول۲ جدایه‌های LAB که درصد بقای آن‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده انسان بالاتر از ۵۰ بوده و برای ادامه مطالعه انتخاب شده‌اند، نشان داده شده است. باکتری‌های پروبیوتیک باید بتوانند ۲ تا ۳ ساعت در محیط معده انسان (با pH حدود ۳ و آنزیم پپسین) دوام آورده و سپس در مدت حدود ٤ ساعت از روده کوچک (با حضور صفرا و آنزیم‌های گوارشی مانند پانکراتین) به سلامت عبور کنند تا اثرات مفید خود را بروز دهند [۳۲, ۳۳] لذا مقاومت نسبت به اسید و صفرا مهم‌ترین و اولین ویژگی یک باکتری پروبیوتیک محسوب می‌شود. در تحقیق حاضر ۲٦/۱ درصد جدایه‌های لاکتیک اسید باکتری که متعلق به جنس‌های لاکتوباسیلوس، انتروکوکوس و پدیوکوکوس بودند مقاومت خوبی (بالای ۵۰ درصد) در شرایط معادل دستگاه گوارش از

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.270]

خود نشان دادند. این یافته در تضاد با نتایج تحقیقات دیگری است که بقای بالایی (۷۱ تا ۷٦ درصد) برای باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از محصولات لبنی تخمیری گزارش کرده‌اند [۳٤, ۳۵]. البته گزارشات محققین دیگری مبنی بر مقاومت‌های پایین‌تر جدایه‌های LAB به شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش انسان، در توافق با نتایج مطالعه حاضر است [۱۰, ۳٦].

Table2. Survival of LAB isolates under artificial human GI tract conditions

Isolates	Survival Rate (%) after 3 h in Simulated Gastric juice [a]	Survival Rate (%) after 4 h in Simulated gut juice [b]	LAB genus
LS6	68.68±0.92	51.65±1.13	*Enterococcus*
LS9	74.14±0.38	77.95±0.78	*Lactobacillus*
LS13	79.92±0.51	54.59±0.89	ND
LS17	66.98±1.14	53.34±0.34	*Enterococcus*
LS18	53.33±0.97	54.93±0.72	*Lactobacillus*
LS33	61.82±0.48	56.39±0.31	*Lactobacillus*
LS37	72.23±0.41	75.37±0.43	*Lactobacillus*
LS50	51.20±0.43	47.42±0.76	ND
LS58	73.64±0.52	78.39±0.42	*Enterococcus*
LS59	86.90±0.69	70.62±0.17	*Enterococcus*
LS64	74.19±0.51	78.01±0.27	*Pediococcus*
LS71	56.49±1.13	54.63±0.55	*Lactobacillus*
LS83	52.20±0.01	58.04±0.48	ND
LS85	48.68±0.92	51.65±1.13	*Pediococcus*
LS99	74.14±0.38	77.95±0.78	*Pediococcus*
LS106	79.92±0.51	54.59±0.89	*Enterococcus*
LS118	66.98±1.14	53.34±0.34	*Lactobacillus*

Data are mean ± standard deviation of three independent experiments.
[a], phosphate-buffered saline solution (adjusted to pH 3) containing 3 mg mL^{-1} pepsin.
[b], PBS solution containing 0.3% bile salts and 1 mg mL^{-1} pancreatin.

۳-۲-۲- خاصیت ضدمیکروبی

از مجموع ۱٤ جدایه منتخب در آزمون قبل که نوع باکتری آن شناخته شده بود، به ترتیب نه و شش جدایه، اثرات بازدارندگی قوی (دارای منطقه عدم رشد بزرگ‌تر از ۱۰ میلی‌متر) بر روی *لیستریا مونوسایتوجنز* و *استافیلوکوکوس آرئوس* نشان دادند (جدول۳). اثرات ضدمیکروبی جدایه‌ها روی باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی کمتر بود به‌طوریکه به ترتیب هفت و پنج جدایه دارای خاصیت ضدمیکروبی بر روی *اشرشیا کولی* و *سالمونلا انتریکا* بودند و از بین آن‌ها فقط سه و یک جدایه LAB ، هاله عدم رشد با قطر بیشتر از ۱۰ میلی‌متر ایجاد کرد (جدول۳). اثرات ضدمیکروبی قوی‌تر باکتری‌های لاکتیک اسید این تحقیق بر روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی در توافق با یافته‌های دانشمندان دیگر است [۳٤, ۳۵]. اثرات ضدمیکروبی باکتری‌های لاکتیک اسید به متابولیت‌های مختلف تولید شده مانند اسید، پراکسید هیدروژن و یا ترکیبات باکتریوسینی آن‌ها نسبت داده می‌شود [۳۷]. با توجه به اینکه در تحقیق حاضر فیلترشده سوسپانسیون باکتری‌های LAB پس از خنثی شدن pH و تیمار شدن با آنزیم کاتالاز مورد آزمایش قرار گرفت لذا اثرات مذکور را می‌توان به متابولیت‌های باکتریوسینی نسبت داد. در مطالعات دیگر هم به نقش این ترکیبات در خواص ضدمیکروبی باکتری‌های LAB اشاره شده است [۲, ۳۸].

Table3. Antibacterial effect of selected LAB isolates against indicator pathogens

Isolates	Zone diameter (mm) around			
	Salmonella enterica (PTCC 1709)	*Escherichia coli* (PTCC 1276)	*Staphylococcus aureus* (PTCC 1764)	*Listeria monocytogenes*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-15]
[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.270]

				(PTCC 1163)
LS6	0	5.48±0.16	7.21±0.26	12.01±0.33
LS9	6.26±0.06	17.47±0.23	12.64±0.28	16.50±0.21
LS17	0	0	0	0
LS18	0	0	11.26±0.05	10.58±0.19
LS33	2.30±0.17	13.59±0.19	21.58±0.20	20.49±0.14
LS37	0	8.54±0.09	0	13.43±0.18
LS58	0	0	0	2.64±0.21
LS59	12.31±0.15	11.43±0.18	18.41±0.20	22.24±0.23
LS64	0	0	0	7.26±0.05
LS71	4.43±0.10	8.54±0.25	13.71±0.19	18.35±0.10
LS85	0	0	8.65±0.24	11.30±0.17
LS99	0	0	0	4.53±0.24
LS106	0	0	16.38±0.15	15.54±0.09
LS118	5.73±0.10	2.46±0.10	0	0

Data are mean ± standard deviation of three independent experiments.

همچنین بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره فیلترشده ۱٤ جدایه LAB در بازداندگی از رشد شعاعی پرگنه کپک‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم* نشان داد که به‌جز ۳ جدایه‌ی LS18، LS64 و LS99 بقیه جدایه‌ها خاصیت ضدقارچی داشتند. در جدول٤ حداقل غلظت بازدارنده از رشد هر کپک (MIC) و درصد بازدارندگی در این غلظت برای جدایه‌های منتخب آورده شده است. تا کنون اثرات ضدقارچی باکتری‌های مختلفی در برابر طیف وسیعی از کپک‌ها به اثبات رسیده است [۳۹] و در میان این باکتری‌ها باکتری‌های LAB نیز به چشم می‌خورد [٤۰, ٤۱]. حتی تحقیقاتی در مورد بکارگیری ترکیبات ضدقارچ حاصل از *لاکتوباسیلوس پلانتارم* به‌عنوان قارچ‌کش و بر علیه کپک‌های بیماری‌زای گیاهی انجام گرفته است [۲۳].

Table4. Antifungal effect of selected LAB isolates against indicator molds

Isolates	MIC (%)	Growth inhibition (%) of *Aspergillus flavus* (PTCC 5004)	MIC (%)	Growth inhibition (%) of *Penicillium citrinum* (PTCC 5304)
LS6	30	14±0.10	30	24±0.04
LS9	40	10±0.09	50	9±0.55
LS17	70	16±0.22	70	13±0.36
LS18	-	-	-	-
LS33	20	21±0.25	20	29±0.30
LS37	100	15±0.30	70	24±0.34
LS58	60	25±0.17	40	10±0.20
LS59	30	21±0.48	30	22±0.11
LS64	-	-	-	-
LS71	20	27±0.07	20	25±0.06
LS85	40	23±0.53	30	18±0.65
LS99	-	-	-	-
LS106	20	20±0.11	30	31±0.23
LS118	100	9±0.40	100	11±0.30

Data for growth inhibition (%) are mean ± standard deviation of three independent experiments.

۳-۲-۳- خاصیت خودتجمعی و تجمع مشترک

نتایج مربوط به توانایی جدایه‌های برگزیده LAB در تجمع با همدیگر و چسبیدن و تجمع با دو باکتری بیماری‌زای *اشرشیا کولی* و *سالمونلا انتریکا* در جدول۵ نشان داده شده است. بر این اساس، قابلیت خودتجمعی، تجمع با *اشرشیا کولی* و تجمع با *سالمونلا انتریکا* به ترتیب در محدوده ۲۱/۲۲ تا ۷۸/٦۰، ۳۱/٤۹ تا ۸۸/۳۳ و ۳۰/۱٤ تا ۸۰/۰۷ متغییر بود. جدایه‌هایی که ارقام بالاتر از ۵۰ درصد برای آن‌ها به

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.270]

ثبت رسید برای ادامه آزمایشات انتخاب گردیدند. ویژگی تجمع باکتری‌ها که در چسبیدن و کلونیزه شدن آن‌ها در اپیتلیوم روده کوچک نقش دارد، یکی از قابلیت‌های مهم و حیاتی یک باکتری پروبیوتیک محسوب می‌شود [٤٢] و بنابراین در بیشتر مطالعات انجام گرفته در مورد بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های LAB ، مورد توجه بوده است [۱۰, ۱۲]. همچنین اتصال باکتری‌های پروبیوتیک به باکتری‌های بیماری‌زا در محیط روده می‌تواند از چسبیدن آن‌ها به جداره روده ممانعت به‌عمل آورده و یک مکانیسم دفاعی در برابر تهاجم این باکتری‌های بیماری‌زا به جدار روده محسوب می‌گردد [۵].

Table5. Aggregation activities of selected LAB isolates

Isolates	Auto-aggregation (%)	Co-aggregation (%) with	
		E. coli	*S. enterica*
LS6	78.60±0.49	88.33±0.18	80.07±0.35
LS9	38.46±0.13	40.30±0.22	50.85±0.40
LS18	40.26±0.24	36.49±0.66	39.57±0.59
LS33	79.53±0.45	59.46±0.36	69.19±0.54
LS37	51.43±0.30	44.46±0.24	30.14±0.39
LS59	21.22±0.39	31.49±0.49	42.44±0.61
LS71	67.57±0.41	87.52±1.33	70.86±0.10
LS85	40.78±0.51	47.87±0.20	35.75±0.40
LS106	56.52±0.37	76.65±0.52	70.43±0.19

Data are mean ± standard deviation of three independent experiments.

۳-۲-٤- مقاومت آنتی‌بیوتیکی

نتایج حساسیت جدایه‌های منتخب LAB به یازده آنتی‌بیوتیک رایج درمانی در جدول٦ آورده شده است. در مجموع، جدایه‌ها حساسیت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده نشان دادند بطوریکه تمام جدایه‌ها نسبت به تتراسایکلین و آمپی‌سیلین حساس بودند. مقاومت چهار جدایه به کلیندامایسین و ۳ جدایه نسبت به ونکومایسین و سفتریاکسون نیز به‌عنوان بالاترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها به ثبت رسید. مقاومت جدایه‌های LAB به وانکومایسین در مطالعه حاضر با مطالعات قبلی که نشان می‌دهد بسیاری از گونه‌های لاکتوباسیلوس مقاومت بالایی به وانکومایسین دارند، توافق دارد [٤١]. برخلاف یافته‌های ما، کوهی و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که هیچ یک از انتروکوکوس‌های جدا شده از پنیر موتال به وانکومایسین مقاوم نبودند. حساسیت باکتری‌های پروبیوتیک به آنتی‌بیوتیک‌های رایج پزشکی از دو جنبه حائز اهمیت است. اول اینکه شائبه بیماری‌زایی برخی باکتری‌های LAB مانند انتروکوکوس‌ها وجود دارد و مثلا انتروکوکوس‌های مقاوم به ونکومایسین یکی از چالش‌های جدی در حوزه عفونت‌های بیمارستانی است [٤٣]. به‌علاوه امکان انتقال افقی ژن[8] مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها بین پروبیوتیک‌ها و سایر باکتری‌های مقیم دستگاه گوارش از جمله باکتری‌های بیماری‌زا ، لزوم ارزیابی و حصول اطمینان از حساسیت پروبیوتیک‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج بالینی را روشن می‌سازد [٤٤].

Table6. Antibiotic resistance in selected LAB isolates

Antibiotics	Inhibition zone diameter (mm) for LAB isolates			
	LS106	LS71	LS33	LS6
Vancomycin	13.5±0.36 (R)	10.6±0.11 (R)	15.4±0.08 (I)	7.3±0.09 (R)
Cefixime	15.5±0.14 (R)	27.4±0.14 (S)	18.1±0.05 (S)	16.3±0.09 (S)
Penicillin	30.6±0.36 (S)	29.4±0.08 (S)	27.3±0.16 (I)	31.1±0.17 (S)
Clindamycin	0 (R)	10.8±0.09 (R)	0 (R)	0 (R)
Tetracycline	31.3±0.11 (S)	25.5±0.15 (S)	23.4±0.09 (S)	29.3±0.15 (S)
Chloramphenicol	22.1±0.38 (S)	26.5±0.18 (S)	18.6±0.15 (I)	29.4±0.23 (S)
Ampicillin	25.2±0.39 (S)	27.4±0.14 (S)	18.5±0.14 (S)	22.3±0.14 (S)

8 -Horizontal gene transfer

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.270]

Erythromycin	26.4±0.22 (S)	20.7±0.33 (I)	24.3±0.22 (S)	21.3±0.39 (S)
Azithromycin	13.4±0.08 (I)	23.5±0.21 (S)	13.7±0.08 (I)	17.4±0.09 (I)
Gentamicin	18.7±0.09 (S)	18.5±0.13 (S)	17.4±0.08 (S)	14.5±0.06 (I)
Ceftriaxone	4.3±0.06 (R)	28.3±0.28 (S)	21.2±0.16 (R)	15.1±0.19 (R)

Data are mean ± standard deviation of three independent experiments.
(I) indicates intermediate sensitivity (R) resistance and (S) susceptibility to the antibiotics based on CLSI, 2018 guideline.

۳-۲-۵- خاصیت همولیتیکی

بررسی قدرت همولیز کنندگی چهار جدایه LS106، LS71، LS33 و LS6 نشان داد که هیچ‌یک از آن‌ها هاله همولیز شفاف یا سبز رنگ تشکیل نداده و فاقد خاصیت همولیز آلفا یا بتا بودند. یکی از جنبه‌های مهم مرتبط با ایمن بودن باکتری‌های پروبیوتیک عدم قدرت همولیز کنندگی آن‌هاست تا به‌واسطه‌ی این ویژگی سبب تخریب سلول‌های جداره روده نشده و آن برای ورود و کلونیزه شدن باکتری‌های بیماری‌زا مستعد نکنند (۲٦). همانند مطالعه‌ی حاضر، در تحقیقات دیگر انجام شده روی باکتری‌های لاکتیک جدا شده از غذاهای تخمیری نیز عدم خاصیت همولیتکی به ثبت رسیده است [٤٥ ,۵].

٤- نتیجه‌گیری

دو سویه LS106 و LS6 متعلق به جنس انتروکوکوس و دو سویه LS71، LS33 متعلق به جنس لاکتوباسیلوس که در مطالعه حاضر از پنیر لیقوان جدا شدند، توانایی زنده ماندن در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش انسان را داشتند. همچنین، این جدایه‌ها ویژگی‌های پروبیوتیکی دیگری مانند فعالیت ضدمیکروبی و تجمع و کلونیزاسیون در روده را دارا بودند. فقدان قدرت همولیز کنندگی این جدایه‌ها و حساسیت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی به‌کار رفته، این جدایه‌ها را به گزینه‌های مناسبی برای استفاده در محصولات غذایی و بهره‌گیری از مزایای سلامت بخشی آن‌ها تبدیل می‌کند. ارزیابی وجود عوامل بیماری زا به‌خصوص در جدایه‌های انتروکوک و انجام تست‌های *in vivo* بر روی مدل‌های حیوانی به منظور حصول اطمینان بیشتر از ایمنی آن‌ها برای مطالعات آینده توصیه می‌شود.

۵- منابع

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

[2] Salek, F., Mirzaei, H., Khandaghi, J., Javadi, A. & Nami, Y. (2023). Identification of enterocins and in vitro characterization of their antimicrobial and anticancer activity in Enterococcus strains isolated from traditional fermented products. Food Hygiene, 13(2), 17-32 (In Persian).

[3] Johnson, M.A. (2017). 100-Year Review: Cheese production and quality. *Journal of Dairy Science*,100(12), 52-65.

[4] Rashtchi, P., Bazmi, A., Noshirvani, N. & Moosavy, M.H. (2021). Comparison of the microbial, physicochemical, and sensorial properties of raw and pasteurized Lighvan cheeses during ripening time. *Food Science & Nutrition*, *9*(10), 5527-5535.

[5] Soleimani, H., Shokri, R., Nami, Y., Khandaghi, J. & Panahi, B. (2023). Potential probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from Duimaj, an Iranian traditional snack food, using biochemical, molecular and computational approaches. *LWT*, *184*, 115091.

[6] Soltan Dallal, M.M., Hosseini, M., Davoodabadi, A., Rajabi, Z. & Zamani, S. (2016). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria in traditional pickles and salted pickles from Tehran, Iran. *Razi Journal of Medical Sciences*, 23(143),81-90 (In Persian).

[7] Koohsari, H., Rashti, Z. & Arab, S. (2019). The Isolation of lactic acid bacteria from local dairy products of Gorgan township with the ability to inhibit the growth of some gastrointestinal pathogens. *Journal of Food Microbiology*, 6(3),22-36 (In Persian).

[8] Nasrollahzadeh, A. ,Khomeiri, M. & Mahmoudi, M. (2019). Genetic identification and evaluation of antibacterial activity of lactic isolates derived from Masske butter against pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*. *Journal of food science and technology (Iran)*, *16*(93), 23-33. (In Persian).

[9] Moraes, P.M., Perin, L.M., Silva Júnior, A. & Nero, L.A. (2013). Comparison of phenotypic and

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.270]

molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44,109-112.
[10] Kouhi, F., Mirzaei, H., Nami, Y., Khandaghi, J. & Javadi, A. (2022). Potential probiotic and safety characterisation of Enterococcus bacteria isolated from indigenous fermented Motal cheese. *International Dairy Journal*,126,105247.
[11] Mathur, H., Beresford, T.P. & Cotter, P.D. (2020). Health benefits of lactic acid bacteria (LAB) fermentates. *Nutrients*,12(6),1679.
[12] Aali, N. & Khandaghi, J. (2022). Evaluation of probiotic properties of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* species isolated from Pousti cheese of Gilan province in 2020. *Journal of Food Microbiology*, *9*(2), 60-70. (In Persian).
[13] Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R. , Mättö, J. & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3),197-215.
[14] Azizi, F., Najafi, M.B.H. & Edalatian Dovom, M.R. (2017). The biodiversity of Lactobacillus spp. from Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation based on bacteriocin-encoding genes. *AMB Express*, 7(1),176-183.
[15] Edalatian Dovom, M.R., Habibi Najafi, M.B. & Mortazavi, S.A. (2014). Identification of Anti-microbial Producing Enterococci Isolated from Iranian Raw Milk Cheeses Using Polyphasic Approach. *Applied Food Biotechnology*, 1(2), 19-24.
[16] Hassanzadazar, H., Mardani, K., Yousefi, M. & Ehsani, A. (2017). Identification and molecular characterisation of lactobacilli isolated from traditional Koopeh cheese. *International Journal of Dairy Technology*, *70*(4), 556-561.
[17] Ahmadi, S., Khomiri, M., Khosroushahi, A. & Kashaninezhad, M. (2009). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) from Iranian traditional Lighvan cheese. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*,16(3),136-146 (In Persian).
[18] Carr, F.J., Chill, D. & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281-370.
[19] Dubernet, S., Desmasures, N. & Guéguen, M.A. (2002). PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS microbiology letters*, 214(2), 271-275.
[20] Nasiri, M. & Hanifian, S. (2022). *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in pasteurized milk: Prevalence, genotyping, and characterization of virulence traits. *LWT*,153:112452.
[21] Cousin, F.J., Le Guellec, R., Chuat, V., Dalmasso, M., Laplace, J.M. & Cretenet, M. (2019). Multiplex PCR for rapid identification of major lactic acid bacteria genera in cider and other fermented foods. *International journal of food microbiology*, 291:17-24.
[22] Turková, K., Mavrič, A., Narat, M., Rittich, B., Španová, A., Rogelj, I. & Matijašić, B.B. (2013). Evaluation of Lactobacillus strains for selected probiotic properties. *Folia microbiologica*, 58(4), 261-267.
[23] Wang, H., Yan, Y., Wang, J., Zhang, H. & Qi, W. (2012). Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PloS one*, 7(1), e29452.
[24] Collado, M.C., Surono, I., Meriluoto, J. & Salminen, S. (2007). Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. *Journal of food Science*, 72(3), M89-M93.
[25] National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2018). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 9th ed. Approved standard M11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
[26] Angmo, K., Kumari, A. & Bhalla, T.C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-food Science and Technology*, 66, 428-35.
[27] Ljungh, A. & Wadstrom, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Current issues in intestinal microbiology*, 7(2), 73-90.
[28] Munekata, P.E., Pateiro, M., Tomasevic, I., Domínguez, R., da Silva Barretto, A.C., Santos, E.M. & Lorenzo, J.M. (2022). Functional fermented meat products with probiotics—A review. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 91-103.
[29] Afshari, A., Hashemi, M., Tavassoli, M., Eraghi, V. & Noori, S.M.A. (2022). Probiotic bacteria from 10 different traditional Iranian cheeses: Isolation, characterization, and investigation of probiotic potential. *Food Science & Nutrition*, 10(6), 2009-2020.
[30] Nami, Y., Haghshenas, B., Bakhshayesh, R.V., Jalaly, H.M., Lotfi, H., Eslami, S. & Hejazi, M.A. (2018). Novel autochthonous lactobacilli with probiotic aptitudes as a main starter culture for probiotic fermented milk. *LWT*, 98, 85-93.
[31] Vidhyasagar, V. & Jeevaratnam, K. (2013). Evaluation of Pediococcus pentosaceus strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro. *Journal of Functional foods*, 5(1), 235-243.
[32] Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189-199.
[33] Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., et al. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 386s-392s.
[34] Haghshenas, B., Nami, Y., Almasi, A., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., et al. (2017). Isolation and characterization of probiotics from dairies. *Iranian journal of microbiology*, 9(4), 234-243.
[35] Mulaw, G., Sisay Tessema, T., Muleta, D. & Tesfaye, A. (2019). In vitro evaluation of probiotic

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.270]

properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented Ethiopian food products. *International journal of microbiology*, 2019, 7179514.
[36] Nigatu, J.M., Tuji, F.A. & Tefera, A.T. (2015). Evaluation of the antagonistic effect of six mixed cultures of lactic acid bacteria, isolated from the Ethiopian fermented milk ergo, against some foodborne pathogens inoculated into the Ethiopian cottage cheese ayib. *African Journal of Microbology Researches*, 9(29),1789-1797.
[37] De Vuyst, L. & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Microbial Physiology*, 13(4),194-199.
[38] Sami, A., Khandaghi, J. & Abbasgholizadeh, N. (2022). Evaluation of Safety Aspects and Antagonistic Activity of Enterococcus Strains Isolated from Traditional Pot Cheese. *Journal of Health*, 13(1),7-16 (In Persian).
[39] Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J. & Kenne, L. (2003). Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 7554-7557.
[40] Prema, P., Smila, D., Palavesam, A. & Immanuel, G. (2010). Production and characterization of an antifungal compound (3-phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 379-386.
[41] Mahjoory, Y., Mohammadi, R., Hejazi, M.A. & Nami, Y. (2023). Antifungal activity of potential probiotic *Limosilactobacillus fermentum* strains and their role against toxigenic aflatoxin-producing aspergilli. *Scientific Reports*, 13(1), 388.
[42] Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. & Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in applied microbiology*, 31(6), 438-442.
[43] Harbarth, S., Cosgrove, S. & Carmeli, Y. (2002). Effects of antibiotics on nosocomial epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6),1619-1628.
[44] Frieri, M., Kumar, K. & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health*, 10(4), 369-378.
[45] Chouraddi, R., Kumar, S., Kumar, B., Bhatia, M., Varada, V.V., Tyagi, N. & Mallapa, R.H. (2023). Techno-functional characterization of fecal lactobacilli isolates of *Bos indicus* calves for probiotic properties. *Veterinary Research Communications*, *47*(3), 1285-1302.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.270]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Investigation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Lighvan cheese

Mehdi Hoseinzadeh[1], Samad Vajdi Hokmabad [2] and Jalil Khandaghi * [3,4]

1. MSc Graduate of Microbiology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.
2. Assistant professor of Animal Sciences, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.
3. Assistant professor of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.
4. *Corresponding author: Department of food Biotechnology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:
Received:2024/5/23
Accepted:2024/11/24

Keywords:

Probiotic,

Lighvan cheese,

Lactobacillus,

Enterococcus

DOI: 10.22034/FSCT.22.158.270.

*Corresponding Author E-gh2002_haghayegh@yahoo.com

khandaghi@iausa.ac.ir

ABSTRACT

The main reason for the presence of specific microbiota, particularly lactic acid bacteria in dairy products made from raw milk, such as Lighvan cheese, is the traditional methods of preparing these products. A large number of these bacteria are probiotic microorganisms, and for example, many species of Lactobacillus, Enterococcus and Pediococcus bacteria presented in foods have shown probiotic properties. In the current study, genus-specific PCR detection for the Lactobacillus, Enterococcus, and Pediococcus genera was used to confirm the isolates of lactic acid bacteria that had been phenotypically isolated from 25 samples of traditional Lighvan cheese. Subsequently, the probiotic properties of the isolates, including resistance in simulated gastrointestinal tract conditions, antagonistic properties, auto-aggregation and co-aggregation attributes, antibiotic resistance and hemolytic activities of the selected strains were evaluated. Based on biochemical and molecular detection tests, among the 84 selected strains, 58 isolates were identified as Lactobacillus (29 isolates), Enterococcus (18 isolates) and Pediococcus (11 isolates). Screening of these isolates for survival in human GI tract conditions showed that 26.1% of the isolates (14 isolates) had resistance levels above 50%. Also, nine isolates of the selected strains showed potent antibacterial activity against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, as well as *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* molds. Moreover, based on the ability of auto-aggregation and co-aggregation features, four isolates LS106, LS71, LS33 and LS6 (belonging to Lactobacillus and Enterococcus genera) were selected. Finally, the investigation of antibiotic resistance revealed the sensitivity of these isolates to majority of the used antibiotics, so that all isolates were susceptible to tetracycline and ampicillin. Also, not one of these four isolates exhibited hemolytic properties. As a result, these isolates are recommended as suitable candidates for usage in fermented food products, taking advantage of their beneficial properties.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.270]