مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی سویه‌های تجاری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* در شرایط برون‌تنی

نازیلا دردمه[۱]، مسعود یاورمنش[۲*]، علی‌عطا معظّمی[۳]، مریم مقدم متین[۴]، سید حمید نوربخش[۵]

۱-دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲-دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳- دانشیار، گروه علوم مولکولی، دانشگاه علوم کشاورزی سوئد، اوپسالا، سوئد.

٤- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۵- دکتری تخصصی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱ /۰۶/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۲

کلمات کلیدی:

ویژگی‌های پروبیوتیکی، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917، *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه لاکتیس-BB 12، دستگاه گوارش.

DOI: 10.22034/FSCT.19.133.91

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.8.3

* مسئول مکاتبات:

Yavarmanesh@um.ac.ir

چکیده

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به میزان کافی، تأثیرات سودمندی بر سلامت میزبان خواهند داشت. در پژوهش حاضر خصوصیات پروبیوتیکی دو سویه تجاری *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 در شرایط برون‌تنی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر دو سویه مقاومت بالایی در برابر اسید، صفرا و لیزوزیم داشتند. به‌طورکلی میزان زنده‌مانی هر دو سویه در شرایط شبیه‌سازی شده معده-روده‌ای بالاتر از ۸۵٪ بود که امکان زنده‌مانی این دو سویه در دستگاه گوارش را فراهم می‌کند. به‌علاوه بالاترین میزان آب‌گریزی (۵۹/۷۵٪) و خودانبوهش (۵۱/۴۲٪) و همچنین کمترین چسبندگی (۸/۳۵٪) به رده سلولی HT-29 روده‌ی انسان مربوط به *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 بود؛ هر دو سویه دارای فعالیت بتا گالاکتوزیدازی بودند و نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، ونکومایسین و تتراسایکلین مقاومت نشان دادند. در پژوهش حاضر مشخص گردید که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 نسبت به *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 خصوصیات پروبیوتیکی بهتری دارد.

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر توجه دنیا به استفاده از غذاهای عملگرا حاوی باکتری‌های پروبیوتیک جهت ارتقای سلامت و پیشگیری از بیماری‌ها افزایش یافته است. مطابق تعریف سازمان بهداشت جهانی[1] (WHO) و سازمان غذا و کشاورزی (FAO)[2] در سال ۲۰۰۱، پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به میزان کافی (10^{7} $CFU.gr^{-1}$)، تأثیرات سودمندی بر روی سلامت بدن میزبان خواهند داشت. باکتری‌های دارای خواص پروبیوتیکی اغلب متعلق به *باکتری‌های اسید لاکتیک* و *بیفیدوباکترها* هستند و به‌طور گسترده در محصولات لبنی و نوشیدنی‌های پروبیوتیک و همچنین به‌عنوان کپسول، پودر و مکمّل‌های غذایی استفاده می‌شوند. از مزایای مصرف پروبیوتیک‌ها می‌توان به کاهش علائم عدم تحمل لاکتوز، کاهش دوره‌ی عفونت حاد گاستروانتریدیس در کودکان، بهبود وضعیت دستگاه گوارش (اسهال مسافرتی و اسهال ناشی از آنتی‌بیوتیک)، کاهش شیوع عفونت‌های واژن، افزایش عملکرد ایمنی و کاهش سطح کلسترول و چربی اشاره کرد. مصرف روزانه حداقل 10^{9}-10^{7} CFU در روز برای کلونیزاسیون کافی پروبیوتیک‌ها در روده ضروری است [۱].

سوش‌های باکتریایی رایجی که به‌عنوان پروبیوتیک به کار گرفته می‌شوند، اغلب متعلق به *لاکتوباسیل‌ها* و *بیفیدوباکترها* هستند. *لاکتوباسیل‌ها* به شاخه *فرمیکیوت* و *بیفیدوباکترها* به شاخه *اکتینوباکتر* تعلق دارند. هر دو میکروارگانیسم گرم مثبت هستند با این تفاوت که درصد مولی C+G در بیفیدوباکتریوم‌ها (بیشتر از ۶۰٪) از لاکتوباسیلوس‌ها (۳۹٪-۳۳٪) بیشتر است و مسیر کاتابولیستی بیفیدوباکترها از طریق شنت بیفیدیوم هگزوزی و آنزیم فروکتوز-۶-فسفوکتولاز انجام می‌شود [۲].

بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه *لاکتیس*[3] در بین *بیفیدوباکترها* از نظر اندازه با ۱۹۳۲۶۹ جفت باز کوچک‌ترین سایز ژنوم را دارد و دارای زیرگونه‌های متعددی مانند AD011، BL-04، DSM 10140، V9، HN019 و BB-12 است. *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 اولین بار در سال ۱۸۹۹ از مدفوع نوزادان شیرخوار جدا و شناسایی شده است. این سویه در سال ۱۹۸۳ در بانک کشت سلولی کریستین هانسن ذخیره شد. مطالعات بالینی نشان داده است که این سویه قادر است در دستگاه گوارش زنده بماند و اثرات سودمندی ایجاد نماید [۳]. *لاکتی‌پلانتی‌باسیلوس پلانتاروم*[4] (که قبلا *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نامیده می‌شد) یک باکتری ناجور تخمیر با سازگاری بالاست که از زیستگاه‌های مختلفی از جمله شیر، میوه، غلات، گرده زنبور عسل و گوشت تازه قابل جداسازی است. همچنین به‌عنوان میزبان مشترک در دستگاه گوارش انسان و سایر جانوران یافت می‌شود [٤]. در بین لاکتوباسیلوس‌ها بزرگترین ژنوم را با ۳۲۵۳۸۷ جفت باز دارد و مجموعه‌ی کامل از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها را تولید می‌کند. لاکتوباسیلوس پلانتاروم نیز در مقابل شرایط مشابه دستگاه گوارش (اسید معده و اسیدهای صفراوی) مقاومت خوبی دارد [۵].

نخستین ضرورت برای توسعه یک فرآورده غذایی پروبیوتیکی انتخاب سویه پروبیوتیکی مناسب است. با توجه به اینکه بروز خصوصیات پروبیوتیکی کاملاً وابسته به جنس و سویه است؛ هدف از پژوهش حاضر ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی دو سویه تجاری *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 و مقایسه خصوصیات عملکردی این دو سویه تجاری در شرایط برون‌تنی بوده است. میزان زنده‌مانی در شرایط مشابه دستگاه گوارش و تحمل اسید و صفرا از جمله معیارهای اصلی ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی محسوب می‌شود که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. همچنین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت به لیزوزیم، ویژگی آب‌گریزی، خودانبوهش، فعالیت بتا-گالاکتوزیدازی و توانایی اتصال سویه‌ها به سلول‌های اپی‌تلیال روده در این پژوهش نیز مورد مطالعه قرار گرفته است.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱- فعال‌سازی باکتری‌ها

بسته‌ی لیوفیلیزه *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیر گونه *لاکتیس* BB-12 از شرکت پیشگامان پخش صدّیق (نمایندگی شرکت کریستین هانسن دانمارک در ایران) و *لاکتوباسیلوس*

1.World health organization
2. Food and agriculture organization
3. *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*
4. *Lactiplantibacillus plantarum*

پلانتاروم ATCC 14917 از کلکسیون میکروبی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. به منظور فعّال‌سازی، استوک باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 پس از خروج از حالت انجماد بر روی محیط کشت ام آر اس[5] (MRS) آگار (ایبرسکو، ایران) کشت سطحی داده شد و در دمای ۳۷ °C به‌مدت ۴۸ ساعت در اتمسفر حاوی ۱۰٪ دی‌اکسید کربن گرم‌خانه‌گذاری شد. بسته لیوفیلیزه باکتری *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 نیز با توجه به دستورالعمل فعّال‌سازی پس از خروج از حالت انجماد در محیط کشت MRS مایع حاوی ال-سیستئین هیدروکلراید (۰/۰۵٪، سیگما-آلدریچ، آمریکا) (MRSC) تحت شرایط کاملاً بی‌هوازی در حضور گازپک A (مرک، آلمان) در دمای ۳۷ °C به مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد.

۲-۲- تهیه سوسپانسیون میکروبی

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 در محیط MRS براث و *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 در محیط MRSC براث در دمای ۳۷ °C به ترتیب به‌صورت هوازی و بی‌هوازی در زمان مناسب گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس محیط کشت رشد یافته به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (g× ۴۶۵۰/۸۸). در ادامه مایع رویی تخلیه و پس از دوبار شست‌وشو با بافر فسفات، رسوب سلولی در این محلول مجدد حل شد. این سوسپانسیون در همه‌ی آزمون‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۳- ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی

۲-۳-۱-تعیین مقاومت نسبت به اسید

ابتدا محیط کشت MRS مایع با استفاده از اسید هیدروکلریک (۳ مولار) و هیدروکسید سدیم (۱ مولار) بر روی pH=۲ و pH=۳ تنظیم شد. محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱ °C به‌مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی، غلظت معادل نیم مک‌فارلند به میزان ۲٪ (حجمی/حجمی) محیط کشت تلقیح شد. میزان زنده‌مانی سویه‌ها بعد از ۶۰ دقیقه (pH=۲) و ۱۸۰ دقیقه (pH=۳) گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ °C تحت شرایط مطلوب هر یک از سویه‌ها از طریق رقت‌سازی متوالی و کشت نقطه‌ای بر روی MRS و MRSC جامد محاسبه شد (رابطه ۱) [۶].

5. de Man, Rogosa and Sharpe (MRS)

درصد زنده‌مانی = $(N/N_0)\times100$ (رابطه ۱)

که در آن N_0 و N به‌ترتیب تعداد کلنی اولیه و ثانویه است.

۲-۳-۲-تعیین مقاومت نسبت به نمک صفراوی

توانایی رشد سویه‌ها پس از تلقیح ۲٪ (حجمی/حجمی) از سویه‌های کشت ۱۸-۱۶ ساعته در محیط MRS و MRSC مایع در حضور ۰/۳٪، ۰/۵٪ و ۱٪ (وزنی/حجمی) نمک صفرای گاوی (سیگما، آمریکا) بررسی شد. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ °C مقاومت سویه‌ها با رقت‌سازی سریالی و کشت نقطه‌ای روی محیط کشت MRS و MRSC آگار مورد ارزیابی قرار گرفت. محیط کشت بدون صفرا نیز به‌عنوان محیط شاهد جهت مقایسه استفاده شد [۶].

۲-۳-۳- تعیین مقاومت در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش

شیره‌ی شبیه‌سازی شده معده و روده در شرایط برون‌تنی از محلول‌سازی پپسین ($mg.ml^{-1}$ ۳؛ سیگما) و پانکراتین ($mg.ml^{-1}$ ۱، سیگما) در محلول نمکی کلرید سدیم (۰/۵٪ (وزنی/ حجمی)) تهیه و با فیلتر سرنگی استریل شد. در ادامه pH شیره شبیه‌سازی شده معده و روده با استفاده از اسید هیدروکلریک (۳ مولار) و هیدروکسید سدیم (۱ مولار) به ترتیب در pH=۳ و pH=۸ تنظیم شدند. سپس با تلقیح ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون تهیه شده از سویه‌های باکتریایی حاصل از کشت ۱۸-۱۶ ساعته در محلول نمکی بافر فسفات در ۱ میلی‌لیتر شیره‌ی شبیه‌سازی شده معده و روده و افزودن ۳۰۰ میکرولیتر محلول نمکی کلرید سدیم (۰/۵٪ (وزنی/حجمی)) به‌خوبی مخلوط و در دمای ۳۷ °C به‌مدت ۱۸۰ دقیقه (عبور از معده) و ۲۴۰ دقیقه (عبور از روده کوچک) گرم‌خانه‌گذاری شدند. مقاومت سویه‌ها پس ازگرم‌خانه‌گذاری با رقت‌سازی سریالی و کشت نقطه‌ای روی محیط کشت MRS و MRSC آگار بررسی شد. تعداد سلول‌های زنده ($CFU.ml^{-1}$) موجود در سوسپانسیون در زمان صفر بر روی محیط کشت آگاردار شمارش شد [۶, ۷].

۲-۳-۴- تعیین مقاومت نسبت به لیزوزیم

برای انجام این آزمون کشت ۱۸-۱۶ ساعته سویه‌ها پس از سانتریفیوژ و جداسازی توده سلولی و شست و شوی آن‌ها در بافر فسفات نمکی (pH= ۷/۴±۰/۱)، در محلول رینگر حل گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی در

محلول الکترولیتی استریل ($CaCl_2$:0.22 $g.l^{-1}$, NaCl: 6.2 $g.l^{-1}$, KCl: 2.2 $g.l^{-1}$, $NaHCO_3$: 1.2 $g.l^{-1}$) حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر لیزوزیم تلقیح و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °C گرم‌خانه‌گذاری شد. محلول الکترولیتی حاوی سوسپانسیون بدون لیزوزیم به‌عنوان نمونه شاهد انتخاب شد. شمارش سلول‌های زنده با روش پلیت کانت بر روی MRS/MRSC آگار انجام شد و درصد زنده‌مانی سویه‌ها بعد از یک ساعت بر حسب $Log\ CFU.ml^{-1}$ نسبت به زمان صفر محاسبه شد [۸].

۲-۳-۵- ارزیابی ویژگی آب‌گریزی

مطابق روش ویندرولا و رنهیمر (۲۰۰۳) پس از سانتریفیوژ و جداسازی سلول‌های حاصل از کشت ۱۸-۱۶ ساعته سویه‌ها در محیط MRS و MRSC مایع در دمای ۳۷ °C و دو بار شست و شو با بافر پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، سوسپانسیون سلولی در همان بافر تهیه شد. جذب سوسپانسیون سلولی در طول موج ۵۶۰ نانومتر تقریباً روی یک تنظیم می‌شود. ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی با ۰/۶ میلی‌لیتر از n-هگزادکان (حلال قطبی) به‌مدت ۱۲۰ ثانیه مخلوط شد. با گذشت زمان در دمای ۳۷ °C دو فاز از هم تفکیک و مایع رویی با دقت جمع‌آوری شد. کاهش جذب در مایع زیری به‌عنوان آب‌گریزی سطح سلول (رابطه ۲) محاسبه شد [۹].

(رابطه ۲) $100\times[(A_0-A)/A_0]$=درصد آب‌گریزی

که A_0 و A به ترتیب جذب قبل و بعد از استخراج با n-هگزا دکان می‌باشد.

۲-۳-۶-آزمون خود انبوهش

سویه‌های دارای بالاترین درصد خود انبوهش، سویه‌های پروبیوتیکی خوبی محسوب می‌شوند، لذا برای ارزیابی این ویژگی سوسپانسیون سلول‌های رشد یافته حاصل از کشت ۱۸-۱۶ ساعته در محلول نمکی بافر فسفات تهیه شد تا دانسیته نوری ۰/۲۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر بدست بیاید. سوسپانسیون باکتریایی (۴ میلی‌لیتر) به‌مدت ۱۰ ثانیه مخلوط و در دمای ۳۰ °C گرم‌خانه‌گذاری شد. جذب نمونه‌ها در ابتدا، پس از گذشت ۳ و ۲۴ ساعت در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و درصد تجمّع خودبخودی با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد [۱۰]:

(رابطه ۳) $100\times[(A_0-A)/A_0]$=درصد خود انبوهش

که A_0 و A به ترتیب جذب در ابتدا و زمان معین می‌باشد.

۲-۳-۷- تعیین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک

به منظور ارزیابی حساسیت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها از آزمون آنتی‌بیوگرام بر اساس الگوی مقاومت انتشار دیسک[6] به روش کربی- بائر استفاده شد. به‌این منظور از کشت ۱۸ ساعته سویه‌های باکتریایی، سوسپانسیونی با کدورت نیم مک‌فارلند تهیه شد. پس از تلقیح هر یک از سویه‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در محیط مولر هینتون آگار[7] (با و بدون ال-سیستئین هیدروکلراید به میزان ۰/۰۵٪ (حجمی/حجمی)) و قرار دادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با کمک پنس استریل در سطح محیط کشت و تثبیت آن (۱۵ دقیقه قرارگیری در دمای محیط)، پلیت‌ها در دمای ۳۷ °C به‌مدت ۴۸ ساعت در شرایط مطلوب رشد هر کدام از سویه‌ها گرم‌خانه‌گذاری شدند. در این آزمون از ۷ نوع دیسک آنتی‌بیوتیک مختلف شامل (میکروگرم بر دیسک): جنتامایسین[8] (۱۰)، اریترومایسین[9] (۱۵)، آموکسی‌سیلین[10] (۲۵)، تتراسایکلین[11] (۱۰)، کلرآمفنیکل[12] (۳۰)، ونکومایسین[13] (۳۰) و پنی‌سیلین[14] (۱۰) استفاده شد. مشاهده هاله عدم رشد بیشتر از ۶ میلی‌متر به‌عنوان فعالیت آنتاگونیستی قوی در نظر گرفته شد [۱۱].

۲-۳-۸-تعیین فعالیت بتا-گالاکتوزیدازی

در ابتدا ۴۰ میلی‌گرم از پودر X-gal (۵-برومو-۴-کلرو-۳-ایندولیل-بتا-دی-گالاکتوپیرانوزید) در ۲ میلی‌لیتر دی‌متیل فرمامید حل شد. سپس ۶۰ میکرولیتر از این محلول و ۱۰ میکرولیتر محلول IPTG (ایزو-پروپیل-تایو-بتا-دی-گالاکتوزیداز) به‌عنوان القاء کننده در سطح محیط جامد MRS و MRSC از پیش آماده شده، پخش گردید. یک کلنی از باکتری‌های مذکور به‌صورت خطی کشت و به‌مدت ۲ روز در دمای ۳۰ °C نگهداری شدند و از طریق رنگ کلنی این ویژگی بررسی شد [۱۰].

6. Disk diffusion
7. Mueller-Hinton agar
8. Gentamicin
9. Erythromycin
10. Amoxicillin
11. Tetracycline
12. Chloramphenicol
13. Vancomycin
14. Penicillin

۲-۳-۹-تعیین قابلیت چسبندگی به سلول‌های اپی‌تلیال روده انسان

رده سلولی HT-29، سلول آدنوکارسینومای اپی‌تلیال روده انسان که موکوس ترشح می‌کند، از آزمایشگاه کشت سلول زیست‌بوم نوآور خیام مشهد خریداری شد. این سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640[15] حاوی ۱۰٪ (حجمی/حجمی) سرم جنین گاوی[16] غیرفعال شده با حرارت و مخلوط استاندارد از آنتی‌بیوتیک‌ها (پنی‌سیلین و استرپتومایسین) در دمای ۳۷ °C تحت فشار ۵٪ دی‌اکسید کربن رشد داده شد. رشد. سلول‌های HT-29 در فلاسک‌های کشت سلولی به‌مدت یک هفته ادامه داشت و یک روز در میان محیط کشت آن تعویض شد. آزمون چسبندگی در پلیت ٦ چاهکی با ۲۵۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر انجام شد.

پس از تشکیل یک لایه نازک از سلول در کف پلیت، جهت حذف آنتی‌بیوتیک دوبار با محلول نمکی بافر فسفات شست‌وشو داده شد و یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی حاصل از کشت ۱۸ ساعته سویه‌ها با غلظتی معادل نیم مک‌فارلند به سلول HT-29 اضافه و به‌مدت ۲ ساعت تحت دمای ۳۷ °C و ۵٪ دی‌اکسید کربن گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس جهت حذف سلول‌های اتصال نیافته، شست‌وشو توسط محلول نمکی بافر فسفات انجام شد. سلول‌های HT-29 و باکتری اتصال‌یافته با استفاده از محلول اتیلن دی آمین تترااسید استیک-تریپسین[17] (سیگما-آلدریچ) جدا شدند و پس از رقت‌سازی سریالی در محیط MRS و MRSC آگار شمارش شدند. توانایی چسبندگی باکتری بر اساس تعداد باکتری‌های چسبیده نسبت به تعداد کل باکتری اولیه گزارش شد [۱۲].

۲-۴- تجزیه‌وتحلیل آماری

آزمون‌ها در قالب طرح بلوک کامل تصادفی و حداقل در سه تکرار با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه و با کمک نرم‌افزار SPSS (آمریکا، نسخه ۲٤) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون دانکن انجام پذیرفت و تمامی تجزیه و تحلیل داده‌ها در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

15. Gibco Roswell Park Memorial Institute medium
16. Fetal bovine serum
17. Ethylenediaminetetraacetic acid-trypsin

۳-نتایج و بحث

۳-۱- مقاومت نسبت به اسید و نمک صفراوی

از معیارهای مهم در بررسی پتانسیل سویه‌های پروبیوتیکی، بررسی مقاومت آن‌ها نسبت به شرایط اسیدی و غلظت بالای نمک‌های صفراوی است [۱۳]. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، هر دو سویه تحمل خوبی در pH=۳ از خود نشان دادند. باکتری *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 در pH=۲ با کمترین کاهش لگاریتمی در تعداد، سویه مقاوم بود؛ درصورتی‌که رشد و زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 در این pH به شدت کاهش پیدا کرد. مقاومت هر دو باکتری پس از گذشت ۳ ساعت در pH = ۳ تقریبا یکسان بود و زنده‌مانی بالای ٨٤٪ از خود نشان دادند. pH معده انسان از ۱/۵ تا ٤/۵ متغیر است اما در اغلب مطالعات برون‌تنی از pH=۳ برای ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی استفاده می‌شود که علت این امر زنده‌مانی بسیار اندک باکتری‌ها در pH=۲ است. سویه‌های پروبیوتیکی زمانی که در معرض pH شدید معده قرار می‌گیرند، توسط غذا و یا سایر حامل‌های مولکولی خاصیت بافری پیدا می‌کنند [١٤]. از سوی دیگر این توانایی تحمل اسید به سنتز ترکیبات پلی‌ساکاریدی مختلف که در حفاظت از غشای سلولی نقش دارند، نسبت داده شده است [۱۵].

مطابق پژوهش جانگرسن و همکاران (۲۰۱٤) سویه *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 در pHهای اسیدی نرخ زنده‌مانی بالایی دارد و این ویژگی به فعالیت کمپلکس F_0F_1-ATPase نسبت داده شده است که قادر است خروج یون‌های هیدروژن را در شرایط اسیدی تسهیل کند و به حفظ هموستازی داخل سلول باکتری کمک کند [١٦]. استاسیاک-روزانسکا و همکاران (۲۰۲۱) در بررسی زنده‌مانی سویه‌های پروبیوتیک تجاری در محدوده pH دستگاه گوارش در ماتریس غذایی دریافتند که سویه *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 قادر به زنده‌مانی بالای ۸۰٪ در pH های ۲ و ۳ بعد از گذشت حداقل یک ساعت می‌باشد [۱۷] که موید نتایج حاصل از پژوهش حاضر است؛ نتایج این پژوهش باسایر پژوهش‌های پیشین نیز مطابقت داشت [۱۱, ١٦, ۱۸].

Table 1 Acid and bile salt tolerance of strains

		Lactobacillus plantarum ATCC 14917		*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB-12	
		Survival (%)	Viable count **	Survival (%)	Viable count**
	Initial count, t= 0 h	-	6.90 ± 0.01 [a]	-	7.06 ± 0.03 [a]
Acid tolerance	pH=2, t= 1 h	29.13	2.01 ± 0.07 [c]	93.48	6.60 ± 0.09 [b]
	pH=3, t= 1 h	89.13	6.15 ± 0.07 [b]	86.40	6.10 ± 0.02 [c]
	pH=3, t= 3 h	88.84	6.13 ± 0.01 [b]	84.99	6.00 ± 0.00 [d]
	0%	-	8.17 ± 0.05 [a]	-	6.80 ± 0.01[a]
Bile salt tolerance	0.3%	99.14	8.10 ± 0.04 [a]	92.35	6.28 ± 0.03 [b]
	0.5%	92.66	7.57 ± 0.04 [b]	91.03	6.19 ± 0.02 [c]
	1%	74.42	6.08 ± 0.01 [c]	86.32	5.87 ± 0.04 [d]

*The values with different superscript letters in a same column are significantly different ($p<0.05$).
** The values are mean Log CFU.ml^{-1} ±SD

نمک‌های صفراوی ترکیبات مشتق شده از کلسترول هستند که در کبد سنتز و در کیسه صفرا به‌عنوان اسیدهای آمینه کنژوگه ذخیره می‌شوند و در فرآیند هضم به درون روده کوچک ترشح و به امولسیفیه کردن و جذب لیپیدها کمک می‌کنند [۱۹].این نمک‌ها به دلیل ایجاد به‌هم‌ریختگی در غشای سلولی برای سلول‌های زنده سمی هستند؛ از این‌رو مقاومت به نمک‌های صفراوی یکی از ویژگی‌های ضروری باکتری‌های اسید لاکتیک محسوب می‌شود [۲۰]. در این پژوهش برای بررسی مقاومت سویه‌ها به نمک‌های صفراوی از غلظت‌های ۰/۳٪، ۰/۵٪ و ۱٪ استفاده شد. نتایج نشان داد که هر دو سویه مقاومت بالایی در برابر صفرا از خود نشان دادند. مطابق جدول ۱، زنده‌مانی سویه‌های *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 در غلظت ۰/۳٪ به‌ترتیب ۹۲/۳۵٪ و ۹۹/۱٤٪ بود؛ همچنین زنده‌مانی برای هر دو سویه در غلظت‌های ۰/۵٪ و ۱٪ به‌ترتیب بالاتر از ۹۱٪ و ۷٤٪ درصد بود که نشان‌دهنده‌ی قابلیت زنده‌مانی و فعالیت این دو سویه در محیط روده کوچک می‌باشد. نتایج نشان داد که سویه *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 در برابر تغییرات غلظت نمک‌های صفراوی مقاومت بالاتری دارد، به‌طوری‌که تغییرات زنده‌مانی سویه‌های *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 بین محدوده‌ی غلظتی ۰/۳٪ تا ۱٪ به‌ترتیب ٦/۰۳٪ و ۲٤/۷۲٪ بود. نمک‌های صفراوی به‌دلیل ماهیت آمفی‌فیلیکی که دارند موجب تخریب غشاهای باکتری و همچنین اعمال تنش اکسیداتیو بر DNA باکتریایی می‌شوند. کولیل‌گلایسین هیدرولاز یا همان هیدرولاز نمک صفرا و آنزیم تجزیه کننده اگزالات اگزالیلک و آنزیم A دکربوکسیلاز و آنزیم اصلی موثر در تحمل نمک‌های هستند [۱۹]. وجود ژن آنزیم هیدرولاز نمک صفرا و فعال بودن آن در سویه *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 این امکان را برای پاسخ سریع به غلظت‌های بالای نمک‌های صفراوی و تسهیل عبور آن از محیط روده کوچک و ورود به روده بزرگ را فراهم می‌نماید [۱٦]. نتایج مطالعه پروتئومیکی[18] و فیزیولوژیکی سویه‌های مقاوم به صفرا در *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* نشان داد ۵ مسیر در این مقاومت دخیل هستند؛ (۱) تغییر در مسیر گلیکولیتیکی و نحوه تولید انرژی (۲) تغییرات مرتبط با متابولیسم نیتروژن که در آن فاکتور سیگما می‌تواند دخیل باشد (۳) تغییرات در بیوسنتز اسیدهای چرب (٤) افزایش در مقدار چاپرون‌های مولکولی و (۵) تغییرات در تعادل ردوکس سلول [۲۱]. مقاومت نسبتاً بالای سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نیز احتمالاً مربوط به بیان پروتئین‌های مقاومت به صفرا در سلول‌های باکتریایی است [٦].

۳-۲- تعیین مقاومت در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش

عبور پروبیوتیک‌ها از دستگاه گوارش با چالش‌های فراوانی روبه‌رو است؛ آنزیم لیزوزیم موجود در بزاق به‌عنوان اولین سد دفاعی بدن، یک پروتئین ضدمیکروبی است که با فعالیت هیدرولازی باعث از هم‌گسیختگی دیواره سلولی باکتری‌ها می‌شود [۲۲]. مواجهه با اسیدیته بالا و حضور پپسین در معده مانع دیگری برای عبور پروبیوتیک‌ها از دستگاه گوارش است. ترشح روزانه ۲/۵۱ لیتر شیره‌ی معده با pH حدود ۲ و فعالیت ضدمیکروبی پپسین موجب تخریب اکثر میکروارگانیسم‌های

18. Proteomic

هضم شده همراه غذا می‌شود. وجود نمک‌های صفراوی و پانکراتین در روده باریک آخرین چالش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در مسیر عبور از دستگاه گوارش است. لذا باید در اغلب مطالعات برون‌تنی جهت انتخاب سویه پروبیوتیکی به این موارد توجه کرد [۹, ۲۳, ۲٤]. مطابق جدول ۲ هر دو سویه نسبت به لیزوزیم (۱۰۰میلی‌گرم بر لیتر) مقاوم بودند؛ بعد از گذشت ۱ ساعت درصد زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 و *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 به ترتیب برابر ۹۸/۵٪ و ۹۷/۷٦٪ بود که این نتایج مطابق با پژوهش‌های پیشین است [۱۱, ۲۳]. دلیل مقاومت *باکتری‌های اسیدلاکتیک* به آنزیم لیزوزیم به ساختار پپتیدوگلیکان دیواره سلولی، وضعیت فیزیولوژیکی سلول و غلظت آنزیم در محیط نسبت داده شده است [۲۵]. مطابق جدول ۲ بررسی زنده‌مانی سویه‌های مورد نظر در شرایط شیره‌ی معده با pH =۳ بعد از گذشت ۳ ساعت نشان داد که هر دو سویه با نرخ زنده‌مانی بیش از ۸۵٪ قادرند این شرایط را پشت سر بگذارند. مقایسه نتایج به‌دست آمده در این بخش با نتایج مقاومت به اسید بیانگر این نکته بود که سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 در محیط اسیدی با pH=۳ زنده‌مانی نسبتاً بهتری از خود نشان می‌دهد که احتمالاً مربوط به پروتئین‌های موجود در MRS براث باشد که اثر حفاظتی بر سلول‌های باکتریایی دارد [٦]. درحالی‌که سویه *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 در حضور پپسین مقاومت نسبتاً بهتری نشان می‌دهد که احتمالاً به دلیل نقش پپسین در حفظ هموستازی pH و فعالیت ATPase غشای سلولی است [۲۰, ۲٦]. نرخ زنده‌مانی سویه‌ها در روده برای *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 به‌ترتیب برابر ۸٦/۹٤٪ و ۹۰/۸۳٪ بود. به‌صورت کلی هر دو سویه در محیط روده نرخ زنده‌مانی بالاتری نسبت به محیط معده داشتند و مقاومت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 در شرایط شبیه‌سازی شده معده–روده بالاتر بود. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه با پژوهش‌های پیشین مطابقت داشت [۷, ۲۰, ۲۷–۲۹].

Table 2 Effect of simulated gastric (pepsin (3 mg ml^{-1}), NaCl (0.5% (w/v)) and pH=3) and intestinal (pancreatin (1 mg ml^{-1}), NaCl (0.5% (w/v)) and pH=8) fluids on the viability of strains.

Strain	Simulated intestinal juice			Simulated gastric juice			Lysozyme resistance
	Survival (%)	Viable count (log (CFU.ml^{-1})), t= 4 h	Viable count (log (CFU.ml^{-1})), t= 0 h	Survival (%)	Viable count (log (CFU.ml^{-1}))t= 3 h	Viable count (log (CFU.ml^{-1})), t= 0 h	Survival (%)
Bifidobacterium animalis subsp. Lactis BB-12	86.94	4.64 ± 0.03	5.33 ± 0.03	85.10	4.49 ± 0.02	5.28 ± 0.02	97.76
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	90.83	4.72 ± 0.04	5.20 ± 0.05	88.20	4.63 ± 0.03	5.26 ± 0.01	98.50

۳-۳- آب‌گریزی، خودانبوهش و فعالیت بتا-گالاکتوزیدازی

ویژگی‌های سطح سلولی که با آزمون‌های خودانبوهش و آب‌گریزی سنجیده می‌شوند از شاخص‌های مهم برای ارزیابی ظرفیت چسبندگی سلول‌های پروبیوتیکی به سلول‌های اپی‌تلیال روده می‌باشند. خودانبوهش به تجمع سلول‌های باکتریایی از سویه یکسان دلالت دارد و یک ویژگی مهم در تشکیل بیوفیلم و محافظت از سویه در شرایط معده–روده و کلونیزاسیون در روده است [۳۰]. خودتجمعی بعد از گذشت ۳ و ۲٤ ساعت و آب‌گریزی در حضور n–هگزادکان در نمودار ۱ آورده شده است. خودانبوهش هر دو سویه بعد از گذشت ۳ ساعت ۱۸/۲۹٪–۱۵/۸٤٪ و بعد از گذشت ۲٤ ساعت ۵۱/٤۲٪–٤۵/۸۹٪ بدست آمد. وانگ و همکاران (۲۰۱۰) بیان نمودند که خودانبوهش بالای ٤۰٪ مطلوب است و سویه‌های با خودانبوهش کمتر از ۱۰٪ خودانبوهش ضعیفی دارند. بالاترین میزان خودانبوهش در این پژوهش به سویه *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 تعلق داشت و با گذشت زمان افزایش پیدا کرد. آب‌گریزی *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 ۵۹/۷۵٪ و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 ٤۲/٤۹٪ بود. آب‌گریزی بالا به گلیکوپروتئین‌های سطح سلول باکتریایی و آب‌گریزی پایین به

پلی‌ساکاریدهای سطح سلول باکتریایی مربوط است. نکته‌ی مهمی که بایستی به آن توجه کرد این است که پتانسیل آب‌گریزی در بین موجودات و سویه‌ها متفاوت است و به سن و شیمی سطح سلول‌های باکتریایی به همراه اجزای محیط بستگی دارد [۱۳]. هر دو سویه مذکور بعد از ٤٨ ساعت تولید کلنی‌های سبز پررنگ کردند که نشان‌دهنده حضور آنزیم بتاگالاکتوزیداز بود. بتا-گالاکتوزیداز لاکتوز را به گالاکتوز و گلوکز هیدرولیز می‌کند و به این ترتیب عدم تحمل لاکتوز را در افراد مبتلا بهبود می‌بخشد. گزارش‌های مشابه توسط سایر پژوهشگران موید نتایج آزمون‌های خود انبوهش، آب‌گریزی و فعالیت بتاگالاکتوزیدازی بود [۸, ۱۱, ۲۹, ۳۱].

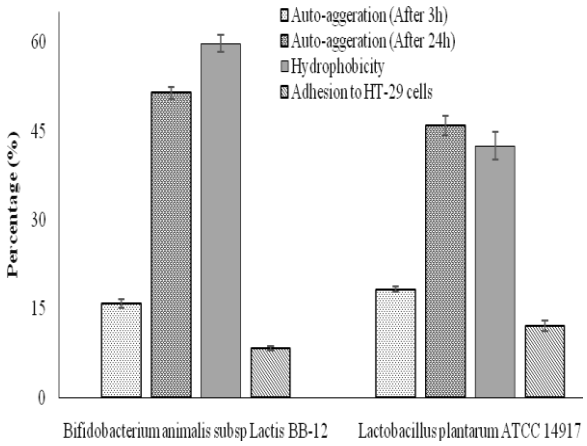

Fig 1 The auto-aggregation (after 3 and 24 h), hydrophobicity and adhesion ability of strains to HT-29 cell line.

۳-۴-مقاومت به آنتی‌بیوتیک

فلور طبیعی روده عمدتاً با مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها دچار اختلال می‌شود که این امر ناهنجاری روده را به‌دنبال دارد. مصرف سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک سبب حفظ فلور طبیعی باکتریایی روده می‌گردد [۳۲]. ایمن بودن از ویژگی‌های مهم سویه‌های پروبیوتیکی است که بخشی از این ایمنی به نداشتن مقاومت به آنتی‌بیوتیک اکتسابی و قابل انتقال مربوط است [۳۱]. نتایج مربوط به مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در جدول ۳ آورده شده است. هر دو سویه *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 نسبت به پنی‌سیلین و ونکومایسین (بازدارنده‌ی سنتز دیواره سلولی) و تتراسایکلین (بازدارنده سنتز پروتئین) مقاوم بودند و نسبت به اریترومایسین، کلرآمفنیکل (بازدارنده سنتز پروتئین) و آموکسی‌سیلین (بازدارنده‌ی سنتز دیواره سلولی) حساسیت داشتند. *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 نیز نسبت به جنتامایسین (بازدارنده سنتز پروتئین) حساس بود. ونکومایسین یکی از آنتی‌بیوتیک‌هایی است که در درمان پاتوژن‌های چند دارویی تجویز می‌شود، بنابراین مقاومت به این آنتی‌بیوتیک یک مساله مهم است که در این پژوهش هر دو سویه نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند [۲۵]. همچنین به‌نظر می‌رسد مقاومت به جنتامایسین در سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ذاتی است. به‌طور کلی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* به آنتی‌بیوتیک‌های گروه آمینوگلیکوزیدی (جنتامایسین، کانامایسین[19]، نئومایسین[20] و استرپتومایسین[21]) مقاوم هستند و به بتالاکتام‌ها (پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین[22])، آنتی‌بیوتیک‌های موثر بر گرم مثبت‌ها (اریترومایسین و نوبیوسین[23]) و آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف (کلرآمفنیکل ، اریترومایسین و ریفامپین[24]) حساس می‌باشند. بررسی منابع نشان داد که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* رفتار متغیّری نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و تتراسایکلین از خود نشان می‌دهد [۳۳]. نتایج این مطالعه با پژوهش‌های پیشین مطابقت داشت [۳۳-۳٦]. از دلایل مقاومت *باکتری‌های اسیدلاکتیک* به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان به سازوکارهای محافظتی مانند اصلاح یا غیرفعال‌سازی دارو، تغییر سایت هدف، تغییر مسیر متابولیکی و کاهش انباشت دارو اشاره کرد [۱۱, ۳۷, ۳۸].

19. Kanamycin
20. Neomycin
21. Streptomycin
22. Ampicillin
23. Novobiocin
24. Rifampin

Table 3 Antibiotic susceptibility of strains

Diameter of inhibition zone (mm)							Strains
Penicillin G	Vancomycin	Chloramphenicol	Tetracycline	Amoxicillin	Erythromycin	Gentamicin	
6.00± 0.00 e	6.00± 0.00e	28.67± 1.24 a	13.66 ± 0.82d	25.50± 0.41b	25.50 ± 0.41 b	16.33 ± 1.24 a	*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB-12
6.00± 0.00 f	6.00± 0.00 f	29.50 ± 0.40 b	11.00 ± 0.81d	28.17 ± 1.64 c	33.67 ± 1.24 a	11.17 ± 1.02e	*Lactobacillus plantarum* ATCC 1491

*The values with different superscript letters in the same column are significantly different ($p<0.05$).
**Gentamycin results based on R ≤ 12 mm; I: 13–15 mm; S ≥ 16 mm. Erythromycin results based on R ≤ 13 mm; I:13–23 mm; S ≥ 23 mm. Tetracycline results based on R≤ 14 mm; I: 15–18 mm; S ≥ 19 mm. Vancomycin results based on R ≤ 12 mm; I: 12–13 mm; S ≥ 13 mm.R: resistant (zone diameter, ≤12.4 mm); I:intermediate (zone diameter, 12.5–17.4 mm); S: susceptible (zone diameter, ≥17.5).

۳-۵- قابلیت چسبندگی به سلول‌های اپی‌تلیال روده انسان

چسبندگی و کلونیزاسیون موقتی پروبیوتیک‌ها در روده از ویژگی‌های مهم جهت ایجاد اثرات سلامت‌بخش در میزبان است [۳۹]. همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است درصد چسبندگی به سلول‌های HT-29 برای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 و *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 به‌ترتیب برابر ۱۲/۱٤٪ و ۸/۳۵٪ بود. مطابق مطالعه ژانگ و همکاران (۲۰۲۰) چسبندگی سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* حداکثر ۱۹٪ بود که با پژوهش حاضر مطابقت داشت [۲۹, ٤۰]. در این مطالعه میزان چسبندگی به‌دست آمده برای *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 بیش از مقدار گزارش شده در پژوهش آربولیا و همکاران (۲۰۱۱) بود [۷]. در این پژوهش میزان چسبندگی هر دو سویه نیز در مقایسه با آب‌گریزی و خودانبوهش، کمتر بود. اگرچه آب‌گریزی و خودانبوهش جزء شاخص‌های ارزیابی در انتخاب سویه پروبیوتیک می‌باشد، با این‌حال الزاماً رابطه مستقیمی با چسبندگی سویه‌ها به سلول‌های اپی‌تلیال روده ندارند [۳۹]. سازوکار چسبندگی سلول‌های *باکتری اسیدلاکتیک* هنوز به‌طور واضح مشخص نشده است ولی گزارش‌ها حاکی از آن است که چسبندگی یک سازوکار چندعاملی است که شامل برهم‌کنش‌های هیدروفوبیکی، استئاریکی و الکترواستاتیکی است و ساختارهای ویژه‌ای مانند فاکتور ازدیاد طول EF-Tu، چاپرونین Gro-EL و چاپرون DnaK را در برمی‌گیرد [۳۰].

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش ویژگی‌های پروبیوتیکی دو سویه‌ی تجاری *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB-12 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 در محیط برون‌تنی مورد بررسی قرار گرفت. هر دو سویه قادر بودند در حضور اسید و صفرا رشد کنند و زنده بمانند، همچنین در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده نرخ زنده‌مانی بالایی نشان دادند. هر دو سویه دارای آنزیم بتا-گالاکتوزیداز بودند، میزان خودانبوهش و آبگریزی بالایی از خود نشان دادند و قادر بودند به سلول‌های اپی‌تلیال روده بچسبند. نتایج ارزیابی عملکرد بهتر سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917 را در شرایط مشابه دستگاه گوارش نشان داد.

۵-منابع

[1] Korona-Glowniak, I., et al., Microbiological evaluation of 10 commercial probiotic products available in Poland. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences, 2019. 32(3): p. 121-124.

[2] Khalesi, S., et al., A review of probiotic supplementation inhealthy adults: helpful or hype? European Journal of Clinical Nutrition, 2018. 73(1): p. 24-37.

[3] Jungersen, M., et al., The Science behind the Probiotic Strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12®. Microorganisms, 2014. 2(2): p. 92-110.

[4] Letizia, F., et al., In Vitro Assessment of Bio-Functional Properties from Lactiplantibacillus plantarum Strains. Current Issues in Molecular Biology, 2022. 44(5): p. 2321-2334.

[5] Robinson, R.K., Encyclopedia of food microbiology. 2014: Academic press.
[6] Yu, Z., et al., Evaluation of probiotic properties of Lactobacillus plantarum strains isolated from Chinese sauerkraut. World Journal of Microbiology and biotechnology, 2013. 29(3): p. 489-498.
[7] Arboleya, S., et al., Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast-milk. International journal of food microbiology, 2011. 149(1): p. 28-36.
[8] Yadav, R., A.K. Puniya, and P. Shukla, Probiotic Properties of Lactobacillus plantarum RYPR1 from an Indigenous Fermented Beverage Raabadi. Frontiers in Microbiology, 2016. 7.
[9] Vinderola, C.G. and J.A. Reinheimer, Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. FoodResearch International, 2003. 36(9-10): p. 895-904.
[10] Angmo, K., A. Kumari, and T.C. Bhalla, Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. LWT-food Science and Technology, 2016. 66: p. 428-435.
[11] Turchi, B., et al., Preliminary evaluation of probiotic potential of Lactobacillus plantarum strains isolated from Italian food products. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013. 29(10): p. 1913-1922.
[12] Jiang, M., et al., Evaluation ofprobiotic properties of Lactobacillus plantarum WLPL04 isolated from human breast milk. Journal of Dairy Science, 2016. 99(3): p. 1736-1746.
[13] Zommiti, M., et al., In vitro assessment of the probiotic properties and bacteriocinogenic potential of Pediococcus pentosaceus MZF16 isolated from artisanal Tunisian meat "Dried Ossban". Frontiers in microbiology, 2018. 9: p. 2607.
[14] Gangadharan, D., et al., Folate - producing lactic acid bacteria from cow's milk with probiotic characteristics. International Journal of Dairy Technology, 2010. 63(3): p. 339-348.
[15] Maragkoudakis, P.A., et al., Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. International Dairy Journal, 2006. 16(3): p. 189-199.
[16] Jungersen, M., et al., The Science behind the Probiotic Strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12®. Microorganisms, 2014. 2(2): p. 92-110.
[17] Stasiak-Różańska, L., et al., Effect of simulated gastrointestinal tract conditions on survivability of probiotic bacteria present in commercial preparations. International journal of environmental research and public health, 2021. 18(3): p. 1108.
[18] Srisesharam, S., et al., Evaluation of probiotic Lactobacillus plantarum against foodborne pathogens and its fermentation potential in improving Lolium multiflorum silage quality. 3 Biotech, 2018. 8(10): p. 1-9.
[19] Gilad, O., Discovery of proteins involved in the interaction between prebiotic carbohydrates and probiotics & Whole proteome analysis of the probiotic strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12. 2012: Enzyme and Protein Chemistry, Technical University of Denmark.
[20] Guo, Z., et al., In vitro comparison of probiotic properties of Lactobacillus casei Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. LWT-FoodScience and Technology, 2009. 42(10): p. 1640-1646.
[21] Sánchez, B., et al., Adaptation and response of Bifidobacterium animalis subsp. lactis to bile: a proteomic and physiological approach. Applied and environmental microbiology, 2007. 73(21): p. 6757-6767.
[22] Orhan, H., et al., Bacteria killer enzyme attached magnetic nanoparticles. Materials Science and Engineering: C, 2019. 94: p. 558-564.
[23] Zago, M., et al., Characterization and probiotic potential of Lactobacillus plantarum strains isolated from cheeses. Food Microbiology, 2011. 28(5): p. 1033-1040.
[24] Huang, Y. and M.C. Adams, In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. International Journal of Food Microbiology, 2004. 91(3): p. 253-260.
[25] Wu, J.W.F.W., et al., First characterization of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Costa Rican pineapple silages. PeerJ, 2021. 9: p. e12437.
[26] Ng, S.Y., et al., Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Malaysian fermented Bambangan (Mangifera pajang). Cyta-Journal of food, 2015. 13(4): p. 563-572.

[27] Ranadheera, C.S., et al., Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. Journal of Functional Foods, 2014. 8: p. 18-25.
[28] Kim, H., et al., Antioxidant and probiotic properties of Lactobacilli and Bifidobacteria of human origins. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2020. 25(3): p. 421-430.
[29] Joghataei, M., et al., Probiotic potential comparison of Lactobacillus strains isolated from Iranian traditional food products and human feces with standard probiotic strains. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019. 99(15): p. 6680-6688.
[30] Shekh, S.L., J.M. Dave, and B.R.M. Vyas, Characterization of Lactobacillus plantarum strains for functionality, safety and γ-amino butyric acid production. Lwt, 2016. 74: p. 234-241.
[31] Pinto, M.G.V., et al., Lactobacillus spp. with invitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. International journal of food microbiology, 2006. 109(3): p. 205-214.
[32] Hummel, A.S., et al., Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. Applied and environmental microbiology, 2007. 73(3): p. 730-739.
[33] Karasu, N., Ö. Şimşek, and A.H. Çon, Technological and probiotic characteristics of Lactobacillus plantarum strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. Annals of microbiology, 2010. 60(2): p. 227-234.
[34] Gueimonde, M., et al., Antibiotic resistance in probiotic bacteria. Frontiers in microbiology, 2013. 4: p. 202.
[35] Zhou, J., et al., Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains. International journal of food microbiology, 2005. 98(2): p. 211-217.
[36] Imperial, I.C. and J.A. Ibana, Addressing the antibiotic resistance problem with probiotics: reducing the risk of its double-edged sword effect. Frontiers in microbiology, 2016. 7: p. 1983.
[37] Klimko, A.I., et al., In vitro evaluation of probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains. Probiotics and antimicrobial proteins, 2020. 12(3): p. 1139-1148.
[38] Nami, Y., et al., Probiotic properties of Enterococcus isolated from artisanal dairy products. Frontiers in Microbiology, 2019. 10: p. 300.
[39] Gharbi, Y., et al., In-vitro characterization of potentially probiotic Lactobacillus strains isolated from human microbiota: interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line HT29. Annals of Microbiology, 2019. 69(1): p. 61-72.
[40] Zhang, X., et al., Probiotic characteristics of Lactobacillus strains isolated from cheese and their antibacterial properties against gastrointestinal tract pathogens.Saudi Journal of Biological Sciences, 2020. 27(12): p. 3505-3513.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

In vitro evaluation of probiotic properties of commercial strains *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium animalis*subsp. *Lactis*

Dardmeh, N. [1], Yavarmanesh, M. [2*], Moazzami , A. [3], Matin, M. [4], Noorbakhsh, H. [5]

1. Ph.D. candidate, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Professor associated, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Professor associated, Department of Molecular Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
4. Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
5. Ph.D., Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

ABSTRACT

Probiotics are recognized as live microorganisms that confer a health benefit to the host when administered in adequate amounts. The present study aimed to evaluate *in vitro* probiotic properties of two commercial probiotic strains, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. Our results indicated that the selected strains showed high resistance to acid, bile salts, and lysozyme. In general, they showed good adaptation to simulated gastric and intestinal juices (more than 85% could survive) which guarantees their survival in the gastrointestinal tract. Moreover, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 showed the highest hydrophobicity (59.75%) and auto-aggregation (51.42%) but the lowest adhesion to the human intestinal HT-29 cell line (8.35%). Furthermore, they both had β-galactosidase activity and were resistant to penicillin, vancomycin, and tetracycline. Our results indicated that *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 had better probiotic characteristics than *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 09/ 18
Accepted 2023/ 02/ 01

Keywords:

Probiotic properties,
Lactobacillus plantarum ATCC 14917,
*Bifidobacterium animalis*subsp, *lactis* BB-12,
Gastrointestinal tract

DOI: 10.22034/FSCT.19.133.91
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.8.3

*Corresponding Author E-Mail:
Yavarmanesh@mail.um.ac.ir