مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی، ضدباکتریایی و ایمنی سویه *Lacticaseibacillus rhamnosus* JCM 1136

بهروز علیزاده بهبهانی*[۱]، حسین جوینده[۲]، پگاه نمازی[۳]

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: ۱۴۰۲/۱۱/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۴

کلمات کلیدی:

باکتری‌های اسید لاکتیک،

فعالیت همولیتیک،

فعالیت ضدمیکروبی،

آمین‌های بیوژنیک.

DOI:10.22034/FSCT.21.149.223.

* مسئول مکاتبات:

B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

چکیده

پروبیوتیک‌ها باکتری‌های غیربیماری‌زا و مفیدی هستند که موجب بهبود سلامت دستگاه گوارش، ممانعت از ابتلا به انواع سرطان، تقویت سیستم ایمنی بدن و ... می‌شوند. هدف از پژوهش حاضر، مطالعه و بررسی پتانسیل پروبیوتیکی و فعالیت ضدمیکروبی سویه *Lacticaseibacillus rhamnosus* JCM 1136 بود. در این پژوهش، ویژگی‌های پروبیوتیکی و ایمنی سویه شامل مقاومت به اسید در PHهای ۲، ۳ و ٤، مقاومت به صفرا (صفر، ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ درصد غلظت نمک صفراوی)، هیدروفوبیستی، پتانسیل تولید آنزیم DNase و آمین‌های بیوژنیک، میزان فعالیت همولیتیک، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان جذب کلسترول، مقدار مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج بررسی شد. اثر ضدمیکروبی سویه علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا (*Shigella dysenteriae*، *Salmonella typhimurium*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Listeria innocua* و *Bacillus cereus*) به‌روش انتشار در آگار به‌کمک چاهک و دیسک ارزیابی گردید. نتایج نشان داد سویه *L. rhamnosus* JCM 1136 توانایی زنده‌مانی در PHهای مختلف را داشت. میزان رشد سویه با افزایش غلظت نمک صفراوی کاهش یافت. *L. rhamnosus* JCM 1136 نسبت به آنتی‌بیوتیک Ampicillin نیمه‌حساس و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بود. هیدروفوبیستی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش های DPPH و ABTS و میزان جذب کلسترول سویه به ترتیب ۰/۵۰ ± ۵۳/۵۰ درصد، ۰/۵۰ ± ٤٤/۲۳، ۰/٦۲ ± ٤۸/۵۰ درصد و ۰/٤۳ ± ٤۱/۵۵ درصد بود. هیچگونه تولید آنزیم DNase، آمین‌های بیوژنیک و فعالیت همولیتیک از سویه مشاهده نشد. *L. rhamnosus* JCM 1136 دارای اثر ضدمیکروبی بیشتری بر باکتری‌های گرم مثبت بود. نتایج نشان داد که *L. rhamnosus* JCM 1136 دارای ویژگی‌های پروبیوتیکی مطلوب می‌باشد و قابلیت کاربرد در تولید محصولات غذایی پروبیوتیکی را نیز دارد.

۱- مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به‌میزان کافی 10^7 CFU/mL، دارای اثرات مطلوبی بر سلامتی انسان می‌باشند [۱]. کلمه پروبیوتیک در لغت به معنای، «برای زندگی» است. باکتری‌های پروبیوتیک ضمن تأثیر بر فلور میکروبی روده، موجب جلوگیری از بروز انواع بیماری‌های عفونی مرتبط با دستگاه گوارش، تقویت سیستم ایمنی، کاهش کلسترول خون، پیشگیری از ابتلا به سرطان، مهار رشد انواع تومورها، کمک به جذب کلسیم و ویتامین‌های B و K، کمک به هضم لاکتوز موجود در فراورده‌های لبنی، کاهش آلرژی و... می‌شوند [۲]. میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک را می‌توان از منابع مختلفی نظیر فاضلاب‌ها، سیستم گوارشی، تناسلی و تنفسی انسان و حیوانات، غذاهای تخمیرشده به‌ویژه لبنیات، میوه ها و سبزی های تخمیری جداسازی نمود. از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی جداشده از غذاهای تخمیرشده می‌توان به *Leuconostoc*، *Veissella*، *Lactobacillus*، *Lactococcus*، *Streptococcus*، *Bifidobacterium* و *Pediococcus* اشاره کرد [۳]. مخمرهایی نظیر *Saccharomyces cerevisiae* و *Saccharomyces boulardii* نیز می‌توانند به‌عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته شوند. رایج‌ترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی، باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشند. این باکتری‌ها ایمن (GRAS[1]) و دارای پتانسیل عملکردی مؤثر در دستگاه گوارش انسان هستند [٤]. به‌منظور بهره‌مندی از خواص بی‌نظیر پروبیوتیک‌ها باید، میزان مقاومت آن‌ها در شرایط دستگاه گوارشی انسان ارزیابی گردد. به‌عبارتی‌دیگر پروبیوتیک‌ها باید توانایی حفظ عملکرد خود در دستگاه گوارش انسان را داشته باشند. در نظر گرفتن یک میکروارگانیسم به‌عنوان پروبیوتیک نیازمند انجام آزمون‌های برون‌تنی[2] و تأیید آن‌ها توسط آزمون‌های درون‌تنی[3] می‌باشد [۱]. از این رو از آزمون‌های مختلفی نظیر تحمل شرایط اسید و صفرا، زنده‌مانی باکتری در دستگاه گوارش، توانایی اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده، پتانسیل کاهش کلسترول، توانایی هیدرولیز نمک‌های صفراوی، غیرهمولیتیک بودن، پتانسیل فعالیت ضدمیکروبی و توانایی زنده‌ماندن در فرآیند تخمیر به‌منظور ارزیابی آن‌ها استفاده می‌شود [۵]. *Lactobacillus* از جمله باکتری‌های گرم مثبت، بی‌هوازی، بدون اسپور، کاتالاز منفی، میله‌ای شکل، میکروآئروفیلیک[4] و گروه مهمی از باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشند. ترکیب باز DNA آن‌ها کمتر از ۵۰ درصد گوانین و سیتوزین (G + C) است. [۱]. میزان ۵ درصد دی‌اکسید کربن در محیط موجب رشد آن‌ها می‌شود و در دمای ۳۰ تا ٤۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین رشد را دارند. بر اساس پژوهش‌های پیشین، PH بهینه برای رشد *Lactobacillus*ها حدود ۵/۵ تا ۵/۸ در نظر گرفته شده‌است در حالیکه آن‌ها قادر هستند در PH کمتر از ۵ نیز به‌خوبی رشد کنند [٦]. برخی از گونه‌های *Lactobacillus*ها ضمن خواص درمانی، دارای فعالیت ضدمیکروبی و دارای توانایی جلوگیری از کلونی‌شدن باکتری های بیماری‌زا هستند. *Lactobacillus*ها موجب حفظ سلامتی انسان و دارای فعالیت متابولیکی هستند که در سراسر دستگاه گوارش گسترده و ۱ تا ٦ درصد از فلور میکروبی روده را تشکیل می‌دهند [۲]. *Lacticaseibacillus rhamnosus* دارای سویه‌های مختلفی و مؤثر بر تقویت سیستم ایمنی علیه تومورهای مختلف می‌باشد. این باکتری وابستگی ژنی با باکتری *Lactobacillus casei* دارد [۷]. هدف از این مطالعه بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی نظیر مقاومت به اسید و نمک صفرا، میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها، میزان کاهش کلسترول، مقدار تولید آنزیم DNase و آمین‌های بیوژنیک، پتانسیل آب‌گریزی سویه، پتانسیل همولیتیکی و فعالیت

1. Generally Recognized as Safe
2. *In vitro*
3. *In vivo*
4. Microaerophilic

ضدمیکروبی باکتری *Lacticaseibacillus rhamnosus* JCM 1136 علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جداسازی و شناسایی سویه *L. rhamnosus* JCM 1136

سویه *L. rhamnosus* JCM 1136 از ماست محلی مطابق روش سبکتکین ریزی و همکاران (۲۰۲۱)، جداسازی شد [۸]. نمونه‌های ماست محلی به‌صورت تصادفی جمع‌آوری و تحت شرایط تبرید به آزمایشگاه منتقل شد. به ۵ گرم از نمونه‌ها، ۴۵ mL آب پپتونه ۰/۱ درصد افزوده شد. نمونه‌ها توسط هموژنایزر (Seaward، ساخت آلمان) هموژن شدند. پس از آماده‌سازی رقت‌ها 10^{-1} تا 10^{-6} به‌صورت سریالی، بر محیط MRS[5] Agar کشت داده شدند. پس از جداسازی سویه از محیط کشت، رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز انجام شد. به‌منظور شناسایی مولکولی، DNA ژنومی از VI کیت و کشت شبانه باکتری در MRS Broth جداسازی شد. پرایمرهای عمومی FYM ۲۷ (5′-AGA GTT TGATYMTGG CTC AG-3′) و R 5′-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3′) ۱۴۹۲) بر اساس تکثیر ناحیه محافظت‌شده قطعه ۱۶S rRNA در این پژوهش استفاده شدند. نتایج نشان داد که ایزوله با خواص کاتالاز منفی و گرم مثبت با میزان شباهت ۹۹ درصد متعلق به سویه *L. rhamnosus* JCM 1136 است.

۲-۲- آزمون مقاومت به اسید

آزمون مقاومت به اسید مطابق با روش برزگر و همکاران (۲۰۲۱)، انجام شد [۹]. جهت بررسی مقاومت به اسید باکتری موردنظر، ابتدا *L. rhamnosus* JCM 1136 در ۵ mL محیط MRS Broth (مرک، ساخت آلمان) تلقیح شد. به‌منظور ایجاد شرایط بی‌هوازی از جار بی‌هوازی استفاده شد و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. با گذشت ۱۸ تا ۲۴ ساعت ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی به لوله فالکون استریل افزوده شد. به منظور جداسازی سلول‌های باکتری از محیط کشت، از دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل (Hermle، ساخت کشور آلمان) با سرعت ۶۰۰۰ g به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. رسوب باکتری توسط محلول بافر فسفات استریل (سیگماآلدریچ) در دو مرحله شستشو داده شد و محیط کشت به‌صورت کامل حذف گردید. به‌منظور جداسازی مایع رویی، محتویات درون فالکون سانتریفیوژ شد. رسوب به‌دست آمده با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Wp، Biowave II، ساخت انگلستان) با طول‌موج ۶۰۰ نانومتر، دارای جذب ۰/۶ در بافر فسفات استریل حل شد. ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه‌شده در ۴ میکروتیوپ حاوی ۴۵۰ میکرولیتر بافر فسفات اسیدی استریل دارای pHهای مختلف ۲ و ۳ تلقیح شد. با گذشت صفر، ۱، ۲ و ۳ ساعت گرمخانه‌گذاری در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، برای هر کدام از نمونه‌ها، رقت‌های متوالی از بافر فسفات استریل تا 10^{-9} تهیه شد. پس از کشت سطحی رقت‌های تهیه‌شده، روی محیط کشت MRS Agar، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط بی‌هوازی به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. با گذشت ۲۴ ساعت کلنی‌های تشکیل‌شده بر سطح محیط کشت توسط کلنی کانتر شمارش و درصد زندمانی باکتری *L. rhamnosus* JCM 1136 با نمونه کنترل مقایسه و ارزیابی شد.

۲-۳- آزمون مقاومت به صفرا

این آزمون مطابق با روش وسیعی و همکاران (۲۰۱۸)، انجام شد [۱۰]. در این روش به‌منظور فعال‌سازی باکتری *L. rhamnosus* JCM 1136 در محیط کشت MRS Broth به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون بر محیط‌های کشت MRS Agar حاوی صفر، ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ درصد از نمک‌های صفراوی کشت داده شد. محیط‌های کشت به‌منظور ایجاد شرایط بی‌هوازی در جار بی‌هوازی و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت

5. De Man, Rogosa and Sharpe

گرمخانه‌گذاری شد. پس از اتمام گرمخانه‌گذاری، نتایج به‌صورت چشمی مشاهده شد.

۲-٤- آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک

ارزیابی میزان حساسیت *L. rhamnosus* JCM 1136 به آنتی‌بیوتیک‌ها مطابق روش طباطبایی یزدی و همکاران (۲۰۱٦)، انجام شد [۱۱]. میزان حساسیت باکتری پروبیوتیکی مورد نظر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی نظیر Ampicillin، Clidamaycin، Nitrofurantion، ChlorampHenical، Ciprofloxacin، Penicillin، Tetracyclin و Erythromaycin مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور پس از گذشت ٤٨ ساعت، از کشت جامد سویه *L. rhamnosus* و تهیه سوسپانسیونی معادل استاندارد نیم مک فارلند، ۱۰۰ میکرولیتر از آن بر محیط MRS Agar کشت سطحی داده شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به‌کمک پنس استریل روی محیط کشت قرار گرفتند. به‌منظور ایجاد شرایط بی‌هوازی پلیت‌ها در جار بی‌هوازی قرار گرفتند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از گذشت ٤٨ ساعت قطر هاله عدم‌رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد ارزیابی قرار گرفت و به‌صورت مقاوم، نیمه‌حساس و حساس گزارش شد.

۲-۵- آزمون قابلیت حذف کلسترول

این آزمون مطابق با روش وسیعی و همکاران (۲۰۲۰)، انجام شد [۱۲]. باکتری *L. rhamnosus* JCM 1136 پس از تلقیح در محیط کشت MRS Broth همراه با محلول استوک کلسترول (سیگماآلدریچ) و ۰/۳ درصد نمک صفراوی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. محیط کشت MRS Broth تلقیح نشده به‌عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد. پس از گذشت ٢٤ ساعت، محیط تلقیح‌شده در سانتریفیوژ با دور rpm ٦۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۸ دقیقه قرار گرفت. سپس به mL ۰/۵ از سوپرناتانت نمونه‌ها، mL ۰/۳ از اتانول ۹۵ درصد (مرک، ساخت آلمان) و mL ۲ از KOH (مرک، ساخت آلمان) افزوده و در حمام آبگرم در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه حرارت دید. mL ۵ هگزان (مرک، ساخت آلمان) و mL ۳ آب‌مقطر افزوده شد. به‌منظور جداسازی فاز، مخلوط به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. mL ۲ هگزان در یک میکروتیوپ ریخته شد و در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. mL ۲ از معرف O-فتال آلدهید[6] (سیگماآلدریچ) به‌مدت ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. پس از گرمخانه‌گذاری mL ۱ اسید سولفوریک غلیظ افزوده شد و در دمای اتاق به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه نگهداری شد. جذب نمونه تلقیح‌شده و تلقیح‌نشده در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد جذب غلظت‌های مختلف کلسترول (صفر، ۳/۹۱، ۷/۸۱، ۱۵/٦۳، ۳۱/۲۵، ٦۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ µg/ mL) رسم شد. جذب کلسترول از رابطه (۱) به دست آمد:

$$\text{درصد جذب کلسترول} = \frac{C-T}{C} \times 100 \quad \text{رابطه (۱)}$$

C: غلظت کلسترول (µg/ mL) در محیط کشت تلقیح‌نشده و T غلظت کلسترول (µg/ mL) در محیط کشت تلقیح‌شده.

۲-٦- آزمون سنجش آب‌گریزی سطح سلول[7]

پتانسیل سویه *L. rhamnosus* JCM 1136 در چسبیدن به حلال غیرقطبی به‌منظور ارزیابی میزان آبگریزی آن مطابق با روش برزگر و همکاران (۲۰۲۱)، انجام شد[۹]. سویه در سانتریفیوژ با g ٦۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. پس از دو بار شستشو با بافر فسفات استریل، به‌منظور رسیدن چگالی نوری سویه‌ها در ٦۰۰ نانومتر به ۰/٦ تا ۰/۷ (OD_0)، سویه‌ها در بافر غوطه‌ور شدند. ۳ میلی‌لیتر از سویه معلق در بافر فسفات استریل به ۱ میلی‌لیتر ان-هگزادکان[8] (مرک، آلمان) افزوده شدند و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. لوله آزمایش حاوی سویه پس از قرار گرفتن در

6. O-Phthalaldehide
7. Hydrophobicity
8. n- hexadecane

ورتکس به‌مدت ۳ دقیقه، در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. در نهایت جذب فاز آبی (OD) آن از طریق رابطه (۲) اندازه‌گیری شد.

رابطه (۲)

$$\text{درصدآب‌گریزی} = \left[\frac{OD_0 - OD}{OD_0}\right] \times 100$$

۷-۲- آزمون بررسی فعالیت همولیتیک

این آزمون مطابق با روش سبکتکین ریزی و همکاران (۲۰۲۱)، انجام شد [۸]. فعالیت همولیتیک سویه JCM *L. rhamnosus* 1136 پس از کشت خطی روی محیط کشت آگار خوندار با ۷ درصد حجمی-حجمی خون گوسفند مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت تلقیح‌شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. 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.

۸-۲- آزمون ارزیابی تولید آنزیم DNase

این آزمون مطابق با روش وسیعی و همکاران (۲۰۲۰)، انجام شد [۱۲].

۹-۲- آزمون بررسی تولید آمین بیوژنیک[9] (BA)

این آزمون مطابق با روش برزگر و همکاران (۲۰۲۱)، انجام شد [۹]. توانایی تولید آمین‌های بیوژنیک توسط سویه *L. rhamnosus* JCM 1136 به‌وسیله دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه بر محیط کشت حاوی پیش‌سازهای اسیدهای آمینه نظیر ال-هیستیدین[10]، مونو هیدروکلرید[11]، نمک تیروزین دی‌سدیم[12]، ال- اورنیتین[13] و ال-لیزین[14] انجام شد. یک بار سویه اسید لاکتیک در محیط کشت MRS Broth حاوی ۰/۱ درصد از پیش‌سازهای اسید آمینه ذکرشده و ۰/۰۰۵ درصد پیریدوکسال۵- فسفات[15] تلقیح شد. بار دیگر سویه مورد نظر در محیط کشت MRS Broth بدون پیش‌سازهای اسید آمینه و حاوی ۰/۰٦ درصد بروموکرزول بنفش (سیگماآلدریچ) تلقیح شد. بعد از ۲ تا ۵ ساعت گرمخانه‌گذاری تشکیل رنگ ارغوانی در محیط کشت به‌منظور تولید آمین‌های بیوژنیک گزارش شد.

۱۰-۲- آزمون ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطابق با روش وسیعی و همکاران (۲۰۲۲)، انجام شد [۱۳]. پس از تلقیح JCM *L. rhamnosus* 1136 در محیط کشت MRS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از شستشو با بافر فسفات استریل در دو مرتبه، در سانتریفیوژ در دور ٤۰۰۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. محلول DPPH[16] ۰/۲ میلی‌مولار (سیگماآلدریچ) به نمونه با نسبت ۱:۲ حجمی-حجمی افزوده شد. در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. محلول ABTS[17] ۷ میلی‌مولار (سیگماآلدریچ) با پتاسیم پرسولفات ۲/٤۵ میلی‌مولار (ساخت کره) به نسبت ۱:۱ حجمی-حجمی ترکیب شد. پس از افزودن آب مقطر جذب محلول در ۷۳٤ نانومتر به ۰/۷ تا ۰/۰۱ رسید. ۳۰۰ میلی‌لیتر از نمونه و ٦۰۰ میلی‌لیتر از محلول ABTS به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر برای DPPH و طول‌موج ۷۳٤ نانومتر برای ABTS خوانده شد. از محلول اسید آسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد توسط سویه مورد نظر از طریق رابطه (۳) محاسبه شد:

رابطه (۳)

$$\text{میزان درصد مهار رادیکال‌های آزاد} = (1 - A_{sample} / A) \times 100$$

در این فرمول، A_{sample} میزان جذب نمونه مورد آزمایش، A میزان جذب نمونه کنترل.

۱۱-۲- آزمون ضدمیکروبی

9. Biogenic amine
10. L-histidine
11. Monohydrochloride
12. Tyrosine di-Sodium Salt
13. L. ornithine
14. L. lysine
15. Pyridoxal 5-phosphate
16. 2.2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
17. 2.2-azinobis ethylbenzothiazline-6-sulfonic acid

به‌منظور ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی سویه JCM 1136 *L. rhamnosus* علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا رایج از روش های انتشار به‌کمک چاهک آگار (Well Diffusion Agar) و دیسک دیفیوژن (Disk Diffusion) استفاده شد. در آزمون بررسی فعالیت ضدمیکروبی از ۳ سویه بیماری‌زا گرم منفی نظیر *Shigella dysenteriae* PTCC 1188، *Salmonella typhimurium* PTCC 1609، *Escherichia coli* ATCC 25922 و ۳ سویه بیماری‌زا گرم مثبت نظیر *Staphylococcus aureus* ATCC 25923، *Listeria innocua* ATCC 33090 و *Bacillus cereus* ATCC 14579 استفاده شد.

به‌منظور آزمون ضدمیکروبی چاهک آگار مطابق با روش نوشاد و همکاران (۲۰۲۱)، پس از فعال‌سازی سویه‌های بیماری‌زا، سوسپانسیون بر اساس استاندارد نیم مک فارلند به تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU/mL تهیه شد [۱]. سوسپانسیون تهیه‌شده از پاتوژن‌ها روی محیط کشت MHA[18] (مرک، ساخت آلمان) به‌کمک اسپیریدر کشت داده شد. در پلیت‌های کشت داده‌شده چاهک‌هایی به قطر ۶ mm به‌کمک انتهای پیپت استریل ایجاد شد. سویه JCM 1136 *L. rhamnosus* فعال‌شده در محیط کشت MRS Broth در دستگاه سانتریفیوژ (Hermle، ساخت کشور آلمان) با دور ۵۰۰۰g، به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به‌منظور تهیه سوپرناتانت فاقد سلول جامد از مایع رویی برداشته و از فیلتر سر سرنگی به‌قطر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. سوپرناتانت اسیدی و خنثی حاصل از سویه JCM 1136 *L. rhamnosus* به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک‌های حفرشده در محیط کشت MHA ریخته‌شد. پس از قرار گرفتن در جار بی‌هوازی به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. قطر هاله عدم‌رشد در اطراف چاهک به‌کمک خط‌کش اندازه‌گیری و به mm گزارش شد.

به‌منظور ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی JCM 1136 *L. rhamnosus* به‌روش انتشار در آگار به‌کمک دیسک، مطابق با روش علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۲)، انجام شد [۶]. دیسک‌های کاغذی با قطر ۶ mm به‌مدت ۱۵ دقیقه در سوپرناتانت تهیه‌شده از سویه JCM 1136 *L. rhamnosus* غوطه‌ور شد. سپس به‌کمک پنس استریل روی محیط کشت MHA کشت داده‌شده با باکتری‌های پاتوژن قرار گرفت. پس از قرار گرفتن در جار بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت هاله عدم‌رشد اطراف دیسک به‌کمک خط‌کش اندازه‌گیری و به mm گزارش شد.

۳- نتایج و بحث

پس از جداسازی و شناسایی مولکولی، نتایج ارزیابی زندمانی JCM 1136 *L. rhamnosus* در PHهای مختلف در شکل ۱، نشان داده شده است. نتایج نشان داد باکتری مذکور قابلیت زنده‌مانی در pHهای مختلف را داشت، در حالیکه با گذشت زمان، زنده‌مانی باکتری مورد نظر در pHهای مختلف کاهش یافت. تعداد JCM 1136 *L. rhamnosus* در pH ۲ پس از گذشت ۳ ساعت ماندگاری، به‌صورت چشمگیری کاهش یافت که بیشترین میزان کاهش لگاریتمی نسبت به سایر pHها بود. تعداد باکتری JCM 1136 *L. rhamnosus* در pH ۴ کمترین کاهش لگاریتمی را داشت، به‌عبارتی باکتری مذکور در pH ۴ دارای بیشترین میزان مقاومت و پتانسل زنده‌مانی بود.

18. Muller Hinton Agar

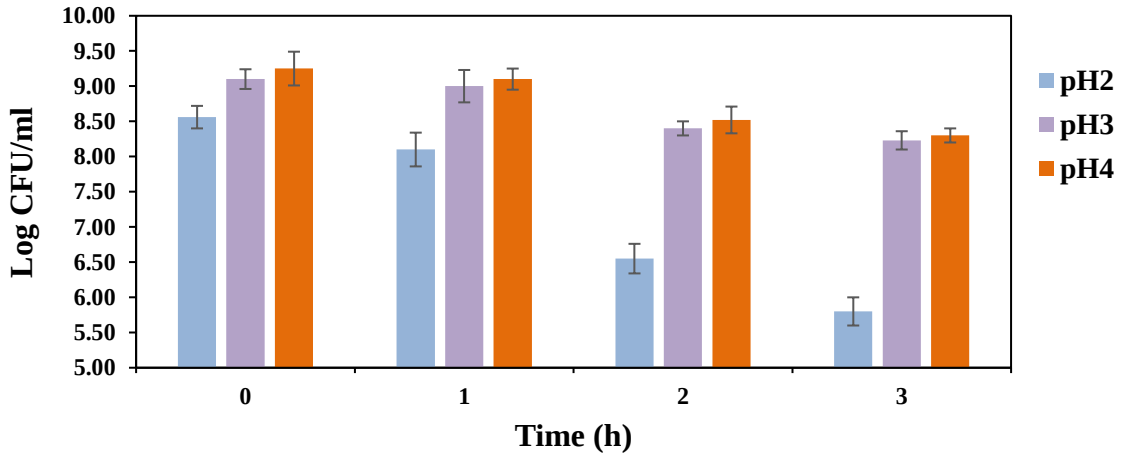

Fig. 1. The capacity of *Lacticaseibacillus rhamnosus* JCM 1136 to endure in an acidic pH environment

.

نتایج آزمون بررسی مقاومت باکتری JCM 1136 *L. rhamnosus* به غلظت‌های مختلف نمک صفراوی در جدول ۱، گزارش شده است. نتایج نشان داد JCM 1136 *L. rhamnosus* نسبت به غلظت‌های مختلف نمک صفراوی مقاومت خوبی دارد. در این پژوهش با افزایش درصد نمک صفراوی، رشد باکتری مورد آزمایش به‌صورت تدریجی کاهش یافت. به‌صورتی‌که در غلظت صفر درصد نمک صفراوی (نمونه کنترل) بیشترین میزان رشد و در غلظت ۰/۷ درصد نمک صفراوی از باکتری مذکور رشدی مشاهده نشد.

Table 1. The ability of *Lacticaseibacillus rhamnosus* JCM 1136 to endure varying concentrations of bile salts

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

نتایج مربوط به بررسی میزان حساسیت باکتری JCM 1136 *L. rhamnosus* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در جدول ۲، گزارش شده است. نتایج این پژوهش نشان داد که JCM 1136 *L. rhamnosus* نسبت به آنتی‌بیوتیک Ampicillin نیمه‌حساس و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بود.

Table 2. Effect of common therapeutic antibiotics on *Lacticaseibacillus rhamnosus* JCM 1136

Antibiotic	***L. rhamnosus* JCM 1136**
Ampicillin	Intermediate
Clidamaycin	Sensitive
Nitrofurantion	Sensitive
ChlorampHenical	Sensitive
Ciprofloxacin	Sensitive
Penicillin	Sensitive
Tetracyclin	Sensitive
Erythromaycin	Sensitive

در پژوهش حاضر، نتیجه آزمون بررسی میزان قابلیت جذب کلسترول توسط سویه *L. rhamnosus* JCM 1136 ۰/۴۳ ± ۴۱/۵۵ درصد بود. نتیجه آزمون آب‌گریزی سطح سلول توسط سویه ۰/۵۰ ± ۵۳/۵۰ درصد بود. هم‌چنین سویه فعالیت همولیتیکی، قابلیت تولید آنزیم DNase و آمین‌های بیوژنیک از خود نشان نداد.

L. rhamnosus JCM 1136 دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود (شکل ۲). در پژوهش حاضر میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS توسط سویه به‌ترتیب ۰/۵۰ ± ۴۴/۲۳ و ۰/۶۲ ± ۴۸/۵۰ درصد گزارش شد.

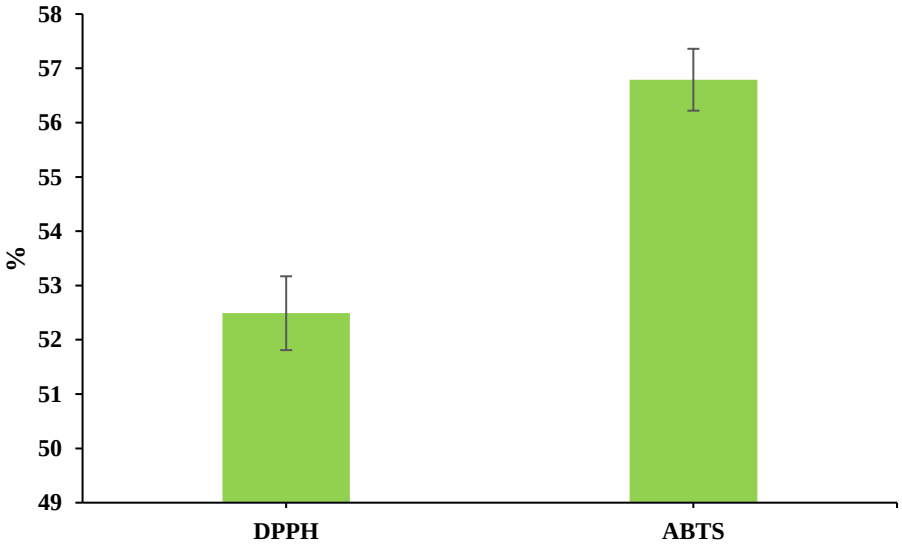

Fig. 2. The antioxidant activity (DPPH & ABTS) of *Lacticaseibacillus rhamnosus* JCM 1136.

نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی سویه *L. rhamnosus* JCM 1136 بر باکتری‌های پاتوژن بیماری‌زا نظیر *Shigella dysenteriae*، *Salmonella typhimurium*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Listeria innocua* و *Bacillus cereus* به‌روش انتشار به‌کمک چاهک آگار و دیسک دیفیوژن در شکل ۳ و ٤ نشان داده شده است. در پژوهش حاضر فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت فاقد سلول در دو حالت اسیدی و خنثی بر پاتوژن‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن است که سویه مورد نظر دارای اثر مهارکنندگی قابل قبول بر سویه‌های بیماری‌زا داشت. در روش چاهک آگار قطر هاله عدم‌رشد برای باکتری *Bacillus cereus*، *Listeria innocua*، *Staphylococcus aureus* به‌ترتیب ۷، ۷/۳۰ و ۷/۵۰ میلی‌متر بود. در حالیکه قطر هاله عدم‌رشد در اثر فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی برای باکتری‌های مذکور به‌ترتیب ۸/۵، ۸/۳۰ و ۹ میلی‌متر بود. در حالت خنثی سویه اثر ضدمیکروبی بر باکتری‌های *Escherichia coli*، *Salmonella typhimurium* و *Shigella dysenteriae* نداشت، درحالیکه سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی دارای اثر ضدمیکروبی بر باکتری‌های *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* بود. قطر هاله عدم‌رشد در اثر فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی *L. rhamnosus* JCM 1136 برای باکتری‌های *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* به‌ترتیب ٦/٥٠ و ٦/٨٠ میلی‌متر بود (شکل ۳).

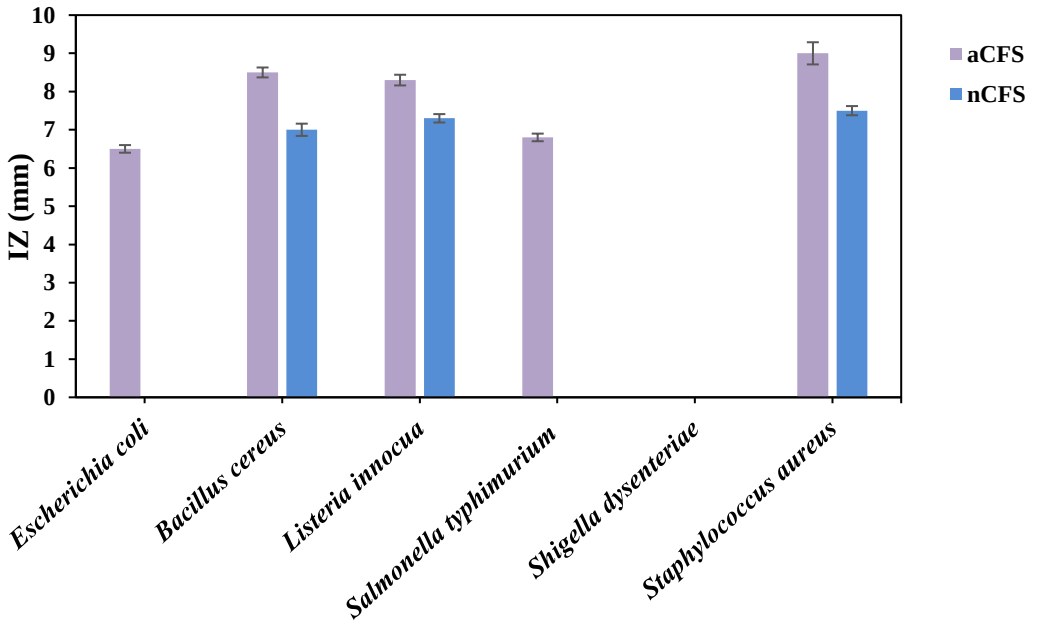

Fig. 3. The antimicrobial potency of *Lacticaseibacillus rhamnosus* JCM 1136 using well diffusion agar. The abbreviations aCFS and nCFS stand for acid cell-free supernatants and neutralized cell-free supernatants, respectively.

قطر هاله عدم‌رشد سوپرناتانت فاقد سلول خنثی به روش دیسک دیفیوژن بر باکتری‌های *Bacillus cereus*، *Listeria innocua* و *Staphylococcus aureus* به‌ترتیب ۶/۸۰، ۷ و ۷/۱۰ میلی‌متر بود. سوپرناتانت فاقد سلول خنثی تأثیر ضدمیکروبی بر باکتری‌های *Escherichia coli*، *Salmonella typhimurium* و *Shigella dysenteriae* نداشت. سوپرناتانت فاقد سلول *L. rhamnosus* JCM 1136 در حالت اسیدی به‌روش دیسک دیفیوژن دارای اثر ضدمیکروبی بر باکتری‌های *Listeria innocua*، *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* بود. قطر هاله عدم‌رشد برای باکتری‌های پاتوژن مذکور به‌ترتیب ۷/۸۰، ۸، ۶/۵۰ و ۸/۶۰ میلی‌متر بود. سوپرناتانت فاقد سلول *L. rhamnosus* JCM 1136 در حالت اسیدی بر باکتری‌های *Escherichia coli* و *Shigella dysenteriae* اثر ضدمیکروبی نداشت (شکل ٤).

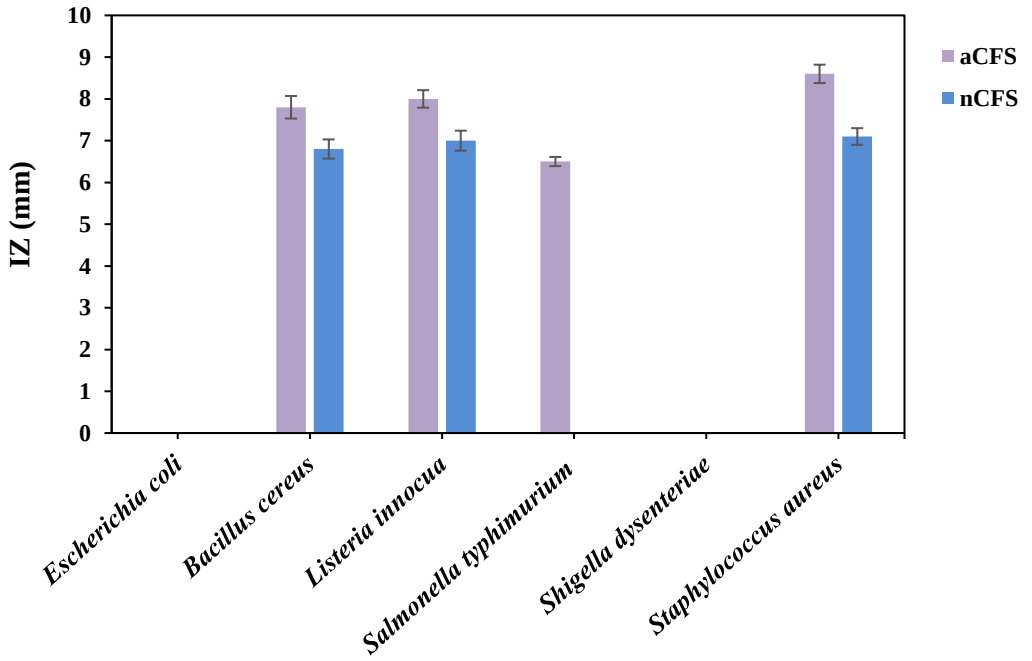

Fig. 4. The antimicrobial potency of *Lacticaseibacillus rhamnosus* JCM 1136 using disk diffusion agar. The abbreviations aCFS and nCFS stand for acid cell-free supernatants and neutralized cell-free supernatants, respectively.

یکی از ویژگی‌های مهم میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی میزان زنده‌ماندن آن‌ها در مواد غذایی و دستگاه گوارش انسان است. از این ویژگی به‌منظور انتخاب گونه‌های پروبیوتیکی در تولید محصولات غذایی استفاده می‌شود [۱۲]. میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی باید توانایی تحمل اسیدیته، نمک‌های صفراوی و فشار اسمزی بالا را داشته باشند تا بتوانند در معده و روده کوچک زنده بمانند [۱٤]. کنترل مسیرهای متابولیک مرکزی، تنظیم پمپ پروتون، تغییرات ترکیب غشای سلولی و تراکم سلولی، ترمیم آسیب‌های DNA و پروتئین‌ها، همچنین فرآیند خنثی‌سازی از جمله مکانیسم‌های مختلفی است که در تنظیم مقاومت به اسید توسط باکتری‌های پروبیوتیک انجام می‌شود. شرایطی نظیر pH اسیدی منجر به کاهش رشد و زنده‌مانی باکتری‌های اسید لاکتیک می‌شود. در معده انسان روزانه ۲ لیتر شیره معده با pH نزدیک به ۱/۵ از سلول‌های پوششی به درون معده ترشح می‌گردد و قابلیت ایجاد اختلال در غشای بیولوژیک باکتری‌ها را به‌علت دوقطبی بودن دارند. بنابراین زنده‌ماندن باکتری‌های اسید لاکتیک در اثر میزان مقاومت آن‌ها در برابر شرایط اسیدی معده می‌باشد [۱۵]. مقاومت به نمک‌های صفراوی یکی از ویژگی‌های مهم میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک است زیرا نمک‌های صفراوی قادرند که در دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها اختلال ایجاد کرده و در نهایت سبب نابودی آن‌ها شوند. پروبیوتیک‌ها با هیدرولیز نمک‌های صفراوی به‌وسیله آنزیم‌های آبکافت‌کننده خود موجب کاهش اثرات نامطلوب آن‌ها می‌شوند. کیسه صفرا به‌وسیله نمک‌های صفراوی در مکانیسم دفاعی اختصاصی و غیراختصاصی روده نقش بسزایی دارد. بر اساس نتایج پژوهش های پیشین، میانگین غلظت نمک صفراوی در دستگاه گوارش انسان ۰/۳ درصد وزنی- حجمی می‌باشد [۱۷].

سرابی جماب و همکاران (۲۰۱۸)، در طی پژوهشی میزان زنده‌مانی *L. rhamnosus* را به‌عنوان باکتری پروبیوتیک شاخص در مدل شبیه‌سازی شده معده‌ای و روده‌ای بررسی نمودند. بر اساس گزارش آن‌ها با گذشت هر ۳۰ دقیقه از زمان گرمخانه‌گذاری در pHهای مختلف، ۱/۵ و ۲/۵ تعداد باکتری کاهش یافت. بطوریکه با گذشت ۲ ساعت از حضور باکتری در محیط روده‌ای، لگاریتم تعداد

باکتری‌های زنده *L. rhamnosus* به ۰/٦٥رسید [۱۷]. در مطالعه دیگر توسط هوک و همکاران (۲۰۱۷)، به‌منظور افزایش زندمانی باکتری *L. rhamnosus* در شرایط معده و روده آن‌را با آلژینات، سلولز نانوکپسول و لیستین کپسوله کردند [۱۸]. ملکی و همکاران (۲۰۲۰)، به‌منظور میکروکپسولاسیون *L. rhamnosus* از ایزوله آب پنیر، اینولین و نانوسلولز کریستالی استفاده کردند [۱۹]. وسیعی و همکاران (۲۰۲۰)، گزارش نمودند سویه *Pediococcus acidilactici* به‌خوبی در غلظت ۰/۳ درصد نمک صفراوی رشد کرد که با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی داشت [۱۲]. هان و همکاران (۲۰۱۷)، ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده از سوسیس‌های تخمیری را مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک در غلظت ۰/۳ درصد نمک صفراوی و pHهای ۳ و ۸ قابلیت رشد خود را حفظ می‌کنند [۲۰]. در مطالعه‌ای باکتری‌های*Lactobacillus* از محصولات لبنی جداسازی شد و میزان رشد آن‌ها در غلظت‌های مختلف نمک صفراوی ۰/۳، ۰/۵ و ۱ درصد بررسی شد. در این پژوهش گزارش شد رشد *Lactobacillus*ها در حضور نمک‌های صفراوی نسبت به نمونه کنترل کاهش یافت اما بیشترین میزان رشد در غلظت ۰/۳درصد نمک صفراوی گزارش شد [٤]. بیسوال و همکاران (۲۰۲۱)، گزارش دادند *L. rhamnosus* دارای قابلیت زنده‌مانی در pH کمتر از ۲/۵ و قابلیت رشد در غلظت ۰/۳ درصد نمک صفراوی می‌باشد [۲۱]. نتایج آن‌ها با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت. در پژوهش دیگری *L. rhamnosus* به‌کمک آلژینات و کیتوزان ریزپوشانی شد. باکتری در برابر آنزیم پپسین با pH ۱/۸ و آنزیم پانکراتین با PH ٦/۸ مقاوم گزارش شد و تعداد باکتری‌های زنده پس از عبور از سیستم شبیه‌سازی شده معده در حد قابل قبول CFU/ml ۱۰٦ تعیین شد [۲۲].

امروزه مقاومت باکتری‌های مختلف به آنتی‌بیوتیک‌ها موجب نگرانی جوامع بشری شده است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی درحالیکه ممکن است در اثر مکانیسم‌های ژنتیکی نظیر انتقال ژن از طریق پلاسمیدها، جهش‌های کروموزومی، انتقال غیرمؤثر آمینوگلیکوزیدها و اصلاح آنزیمی اتفاق بیفتد، گاهی نیز به‌صورت طبیعی در باکتری‌ها ایجاد می‌شود [۱۵ و ۲۳]. مقاومت باکتری‌های اسید لاکتیک نسبت به آنتی‌بیوتیک ممکن است ناشی از عدم‌وجود محل هدف آنتی‌بیوتیک در باکتری پروبیوتیک، غیرفعال بودن آنتی‌بیوتیک و ... باشد. بر اساس مطالعه ها، انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌های اسید لاکتیک به وقوع پیوسته است. برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک در برابر یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاوم هستند، از این رو نگرانی‌هایی به‌منظور استفاده از این باکتری‌ها در تولید مواد غذایی مختلف و مصرف آن‌ها توسط انسان‌ها وجود دارد. مکانیسم مهم باکتری‌های اسید لاکتیک به‌منظور مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها حضور پمپ‌هایی می‌باشد که موجب انتشار آنتی‌بیوتیک به خارج از سلول و درنتیجه کاهش غلظت آن در سلول می‌شود [۲۳]. نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن بود که باکتری *L. rhamnosus* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های Clidamaycin، Nitrofurantion، ChlorampHenical، Ciprofloxacin، Penicillin، Tetracyclin، Erythromaycin حساس و نسبت به آنتی‌بیوتیک Ampicillin نیمه‌حساس بود. در مطالعه‌ای توسط شمس‌الدین و مظهرالدین خان (۲۰۱۹)، میزان حساسیت سویه‌های*Lactobacillus* جداشده از غذاهای تخمیری نظیر سویه‌های *Bifidobacterium bifidum* را نسبت به دوازده آنتی‌بیوتیک بررسی و گزارش نمودند سویه‌های جداسازی‌شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های Amikacin، Ampiclox، Ciprofloxacin، Clarithromycin، Cefotaxime، Levofloxacin، Cefuroxime، Gentamycin، Cefoperazone، Roxithromycin، Cotrimoxazole و Azithromycin حساس بودند [٢٤]. در مطالعه‌ای دیگر میزان حساسیت باکتری‌های *Pediococcus pentosaceus* و *Lactobacillus paraplantarum* جداشده از انواع خمیر ترش را نسبت به آنتی‌بیوتیک Ampicillin حساس و نسبت به آنتی‌بیوتیک Vancomycine، Streptomycine،

Acid nalidixique و Ciprofloxacine مقاوم گزارش دادند. دلیل مقاومت جدایه‌های لاکتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک Vancomycine به‌دلیل حضور D-آلانین به‌جای D-لاکتات یا D-سرین در ساختار پپتیدوگلیکان باکتری‌ها گزارش شد [۲۳]. بیسوال و همکاران (۲۰۲۱)، گزارش دادند که سویه *L. rhamnosus* CRD4 نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های Ciprofloxacin، ChlorampHenical، Amoxicillin، Ampicillin و Tetracayclin دارای حساسیت است [۲۱]. نتایج آن‌ها با نتایج پژوهش حاضر شباهت داشت.

در حالیکه وجود کلسترول برای برخی از بافت‌های بدن ضروری است، اما افزایش کلسترول در خون انسان موجب بیماری‌های قلبی، عروقی و ... می‌شود. باکتری‌های پروبیوتیک قابلیت جذب کلسترول و حذف رادیکال‌های هیدروکسیل را دارند. از این رو توجه جامع بشری به باکتری‌های اسید لاکتیک در حال افزایش است. در پژوهشی گزارش شد باکتری *Pediococcus acidilactici* IAH-5 بیشترین میزان جذب کلسترول را از خود نشان داده است. به‌طور کلی میزان کاهش کلسترول توسط پروبیوتیک‌ها مرتبط با نوع سویه، میزان تولید ترکیباتی که منجر به مهار آنزیم ۳- هیدروکسی ۳- متیل گلوتاریل کوآنزیم A^{19}، میزان فعالیت هیدرولاز نمک صفراوی و میزان توانایی جذب کلسترول سویه‌های پروبیوتیکی می‌باشد [۱۲].

ویژگی هیدروفوبیستی یا آب‌گریزی خصوصیتی است که به‌وسیله اجزای آب‌گریز که در غشای خارجی باکتری‌ها وجود دارند، ایجاد می‌شود. ویژگی آب‌گریزی سویه‌های پروبیوتیکی مرتبط با ظرفیت آن سویه‌ها به‌منظور اتصال به منابع غیرقطبی است. این ویژگی به‌عنوان اثر متقابل هیدروفوبیکی شناخته شده است و نقش مؤثری در چسبندگی باکتری‌ها به سلول‌های اپی‌تلیال دارد [۱]. به‌منظور بررسی این ویژگی می‌توان از ترکیباتی نظیر زایلن[۲۰]، n-هگزادکان[۲۱]، کلروفرم[۲۲] و اتیل استات[۲۳] استفاده کرد. هیدروفوبیستی پس از ترکیب کردن سوسپانسیون میکروبی و محلول غیرقطبی و اندازه‌گیری OD_{600} سطح آبی، پیش و پس از افزودن محلول محاسبه می‌شود [۱۲]. در پژوهش حاضر میزان آب‌گریزی سویه *L. rhamnosus* JCM 1136، ۰/۵۰ ± ۵۳/۵۰ درصد گزارش شد. در مطالعه سبکتکین ریزی و همکاران (۲۰۲۱)، میزان آب‌گریزی سویه *L. plantarum* TW29-1 ۵۳ درصد گزارش شد [۸]. نتایج این پژوهشگران با نتیجه پژوهش حاضر مطابقت داشت. در مطالعه‌ای میزان آب‌گریزی سویه *L. rhamnosus* CRD 4، در حضور زایلن ۱/۱۰ ± ۷۰ درصد، در حضور تولوئن ۱/۲۳ ± ۷۰ درصد و در حضور کلروفرم ۱/۰ ± ۵۷ درصد گزارش شد [۲۱]. در پژوهش برزگر و همکاران (۲۰۲۱)، میزان آب‌گریزی سویه *L. acidopHilus* B14، ۶۵/۹ درصد گزارش شد [۹]. تفاوت در میزان آب‌گریزی سویه‌های پروبیوتیکی به نوع سویه، ناهمگونی ساختار شیمیایی، فاز رشد سلولی، عوامل محیطی و درجه پلئومورفیسم[۲۴]، نیروی واندروالسی، حرکت براونی[۲۵]، بار الکتریکی سطح و نیروی گرانش مرتبط می‌باشد. تفاوت در پروتئین‌های درون سلولی، اسید آمینه‌های آب‌گریز، پروتئین‌ها و لیپیدها غشای سیتوپلاسمی و پلی‌ساکاریدها در میزان آب‌گریزی سویه‌های پروبیوتیکی نیز مؤثر است [۱ و ۹]. S-layer یک لایه تک مولکولی از جنس پروتئین‌های یکسان و گلیکوپروتئین‌ها می‌باشد. این لایه نقش مهمی در حرکت براونی باکتری‌های پروبیوتیک و خواص هیدروفوبیستی آن‌ها دارد. ویژگی آب‌گریزی در باکتری‌های پروبیوتیک مورد استفاده در صنایع غذایی به‌ویژه در زمینه لبنیات به‌علت تمایل به اتصال مولکول‌های چربی شیر و ایجاد ثبات در امولسیون‌ها حائز اهمیت است [۱].

به‌منظور ارزیابی میزان ایمن بودن کاربرد سویه‌های پروبیوتیک از دو آزمون بررسی ویژگی همولیتیک و میزان تولید آنزیم DNase استفاده می‌شود. آنزیم DNase یا دئوکسی ریبونوکلئاز[۲۶] موجب آبکافت پیوندهای فسفو دی

19. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
20. Xylene
21. n-Hegzadecan
22. Chloroform
23. Ethyl acetate
24. Pleomorphism
25. Brownian movement
26. Deoxyribonuclease

استر در ساختار DNA می‌شود. در برخی محصولات غذایی برای مثال در شیر خشک نوزادان، آرژنین به‌عنوان اسید آمینه ضروری وجود دارد. از این رو در صورت استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک در محصولات غذایی بسیار حائز اهمیت است که اسید آمینه مذکور توسط باکتری هیدرولیز نشود [۲۵]. در پژوهش حاضر از سویه *L.* JCM 1136 *rhamnosus* فعالیت همولیتیک و تولید آنزیم DNase مشاهده نشد. از این رو این سویه دارای کاربرد ایمن به‌منظور تولید محصولات غذایی پروبیوتیکی می‌باشد. وسیعی و همکاران (۲۰۲۰)، گزارش نمودند سویه‌های *Pediococcus* جداسازی شده از محصولات لبنی محلی ایرانی فاقد تولید آنزیم DNase و فعالیت همولیتیک بودند [۱۲]. سبکتکین ریزی و همکاران (۲۰۲۱)، گزارش دادند که سویه *Lactobacillus plantarum* TW29-1 جداسازی شده از محصول لبنی محلی نیز فاقد تولید آنزیم DNase و فعالیت همولیتیکی بود [۸]. نتایج پژوهش حاضر با نتایج محققین مذکور مطابقت داشت.

باکتری‌های اسید لاکتیک به‌ویژه *Enterococcus*ها و *Lactobacillus*ها توانایی تولید آمین‌های بیوژنیک را دارند. این ویژگی در باکتری‌های اسید لاکتیک نامطلوب تلقی شده و باکتری‌های اسید لاکتیکی که فاقد این ویژگی هستند، به‌عنوان باکتری پروبیوتیک استفاده می‌شوند. در پژوهش حاضر، هیچگونه پتانسیلی در تولید آمین‌های بیوژنیک در سویه *L. rhamnosus* JCM 1136 مشاهده نشد. پتانسیل تولید آمین‌های بیوژنیک می‌تواند در سویه‌های مختلف یک گونه باکتری متفاوت باشند از این رو شناسایی و تعیین ویژگی‌های سویه‌های باکتریایی برای استفاده به‌عنوان سویه‌های پروبیوتیکی حائز اهمیت است [۲۵]. آمین‌های بیوژنیک توسط آمیناسیون[۲۷] و ترانس آمیناسیون[۲۸] آلدهیدها و کتون‌ها یا در اثر دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه به‌وجود می‌آیند. آمین‌های بیوژنیک را می‌توان در محصولات غذایی حاوی پروتئین و اسید آمینه‌های آزاد که تحت فرآیندهای بیوشیمیایی و میکروبی نظیر تخمیر قرار می‌گیرند، یافت. معمولاً منشاء آن غذاهای مرتبط با ماهی، سوسیس‌های تخمیری، پنیرها و سایر محصولات غذایی تخمیری است. وجود یا عدم‌وجود هیستامین و تیرامین در محصولات غذایی پروبیوتیکی به‌منظور بررسی خواص سمی و آلرژیک پروبیوتیک‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد [۹]. برزگر و همکاران [۹] و فاطمی‌زاده و همکاران [۲۵] گزارش دادند که سویه‌های *Lactobacillus plantarum* M17 و *Lactobacillus acidopHilus* B14 فاقد پتانسیل تولید آمین‌های بیوژنیک هستند. نتایج پژوهش حاضر با نتایج محققین مذکور مطابقت داشت.

مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها موجب کاهش استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف بدن انسان می‌شود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی باکتری‌های اسید لاکتیک زمانی به‌وقوع می‌پیوندد که از طریق مصرف محصولات غذایی پروبیوتیکی وارد روده انسان شده باشند. این باکتری‌ها پس از ورود به مجرای روده موجب نابودی رادیکال‌های آزاد مختلف می‌شوند. پروبیوتیک‌ها به‌علت میزان بالای ۱/۳-β-D-گلوکان[۲۹] و سایر β-گلوکان‌ها در دیواره سلولی خود، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز هستند. باکتری *Pediococcus acidilactici* IAH-5 دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به باکتری *L. rhamnosus*، با قابلیت مهار ۵۸/۳۲ درصد از رادیکال‌های هیدروکسیل گزارش شده است [۱۲]. بر اساس پژوهش های پیشین *Enterococcus durans* به‌علت فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا و قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد ABTS به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در محصولات غذایی استفاده شود [۲۶]. یون آهن موجود در ترکیباتی نظیر EDTA[۳۰] و باتوفنانترولین دی‌سولفیک اسید[۳۱] (BPS) در ممانعت از اکسیداسیون مؤثر است. باکتری‌های اسید لاکتیک ضمن اینکه با داشتن یون‌های آهن و مس قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد را دارند، با داشتن ترکیباتی نظیر، اسیدهای آلی، باکتریوسین‌ها، اگزو

27. Amination
28. Transamination
29. β- D- glucan
30. Ethylene Diamine Tetraactic Acid
31. Bathophenanthroline disulfonic acid

پلی‌ساکاریدهای باکتریایی، منگنز، گلوتاتیون[32] (GSH)، بوتیرات[33]، فولات[34] و آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز[35] نیز دارای قابلیت ممانعت از اکسیداسیون هستند. سوپر اکسید دیسموتاز آنزیمی است که با کاتالیز سوپر اکسید آن‌را به پراکسید هیدروژن و آب تبدیل می‌کند [۱۳ و ۲۷]. به‌منظور ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی سویه *L. rhamnosus* JCM 1136، از آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS استفاده شد. مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS توسط سویه مورد نظر به‌ترتیب ۰/۵۰ ± ۴۴/۲۳ و ۰/۶۲ ± ۴۸/۵۰ درصد بود. در پژوهشی یانگ و لی (۲۰۲۲)، گزارش دادند که میزان مهار رادیکال‌های DPPH توسط باکتری *L. rhamnosus* ۷۳/۰۲ درصد بود [۲۸]. تفاوت در نتایج مذکور می‌تواند مرتبط با نوع سویه و شرایط انجام آزمون باشد. در مطالعه‌ی دیگری، کیم و همکاران (۲۰۲۲)، میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH ۲/۵۵ – ۶/۸۸ درصد و میزان مهار رادیکال‌های آزاد ABTS توسط باکتری‌های اسید لاکتیک ۱۹/۶۹ – ۸۶/۲۶ درصد گزارش دادند [۱۳].

پژوهشگران علت فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا را رقابت با پاتوژن‌ها بر سر جایگاه اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده و وجود اسیدهای مختلف نظیر اسید استیک، اسید لاکتیک، اسید پروپیونیک، اسید سوربیک و اسید بنزوئیک، ترکیبات آلی نظیر دی‌استیل، اتانول، پراکسید هیدروژن، فنول‌ها، آمونیاک، پروتئین با وزن مولکولی کم که به باکتریوسین‌ها مشهور هستند و متابولیت‌های مهارکننده شبه باکتریوسین (BLIS) گزارش نموده‌اند [۲۹ و ۳۰]. باکتریوسین‌ها علاوه بر اینکه در مکانیسم سنتز لیپید II در دیواره سلولی پاتوژن‌ها اختلال ایجاد می‌کنند، موجب ممانعت از فعالیت آنزیم‌هایی نظیر RNA پلیمراز و tRNA سنتتاز در آن‌ها نیز می‌شود [۲۳]. در پژوهش حاضر فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی و خنثی *L. rhamnosus* JCM 1136 علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا به‌روش انتشار در آگار به‌کمک چاهک و دیسک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود قطر هاله عدم‌رشد پاتوژن‌ها توسط سویه مورد نظر در روش چاهک از صفر تا ۹ میلی‌متر متفاوت بود. بیشترین قطر هاله عدم‌رشد مربوط به فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی بود. قطر هاله عدم‌رشد پاتوژن ها نسبت به سوپرناتانت فاقد سلول خنثی سویه *L. rhamnosus* JCM 1136، برای باکتری های بیماری‌زا گرم مثبت *Staphylococcus aureus* ۰/۲۹ ± ۷/۵۰ میلی‌متر، *Listeria innocua* ۰/۲۷ ± ۷/۳۰ میلی‌متر و *Bacillus cereus* ۰/۲۳ ± ۷ میلی‌متر بود. قطر هاله عدم‌رشد پاتوژن ها نسبت به سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی سویه JCM 1136 *L. rhamnosus*، برای باکتری های بیماری‌زا گرم مثبت *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus* و *Listeria innocua* به‌ترتیب ۰/۲۷ ± ۹، ۰/۱۵ ± ۸/۵۰ و ۰/۱۹ ± ۸/۳۰ میلی‌متر بود. مقاوم‌ترین پاتوژن در برابر اثر ضدمیکروبی سوپرناتانت فاقد سلول باکتری گرم منفی *Shigella dysenteriae* بود، بطوریکه هیچگونه اثر ضدمیکروبی مشاهده نشد. قطر هاله عدم رشد سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی برای باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* به ترتیب ۰/۱۳ ± ۶/۵۰ و ۰/۱۲ ± ۶/۸۰ میلی‌متر بود. قطر هاله عدم‌رشد سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی و خنثی سویه *L. rhamnosus* JCM 1136، به روش دیسک دیفیوژن، از صفر تا ۸/۶۰ میلی‌متر متفاوت بود. در این روش نیز، بیشترین میزان فعالیت ضدمیکروبی مربوط به سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی بود. حساس‌ترین پاتوژن‌ها نسبت به سوپرناتانت فاقد سلول خنثی به‌روش دیسک دیفیوژن، باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus*، *Listeria innocua* و *Bacillus cereus* به‌ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۰/۲۵ ± ۷/۱۰، ۰/۱۳ ± ۷ و ۰/۱۸ ± ۶/۸۰ میلی‌متر بود. حساس‌ترین سویه پاتوژن‌ها نسبت به سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی باکتری‌های بیماری‌زا گرم مثبت *Staphylococcus aureus*، *Listeria innocua* و *Bacillus cereus* با قطر هاله

32. Glutathione
33. Butyrate
34. Folate
35. Super Oxide Dismotase

عدم رشد به‌ترتیب ۰/۲۲ ± ۸/۶۰، ۰/۱٤ ± ۸ و ۰/۱۱ ± ۷/۸۰ میلی‌متر بود. سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی و خنثی JCM 1136 *L. rhamnosus*، اثر ضدمیکروبی بر باکتری‌های گرم منفی *Shigella dysenteriae* و *Escherichia coli* نداشت. باکتری گرم منفی *Salmonella typhimurium* نسبت به سوپرناتانت فاقد سلول خنثی مقاوم بود در حالیکه قطر هاله عدم‌رشد آن در حالت اسیدی ۰/۱۰ ± ٦/٥۰ میلی‌متر بود. نتایج آزمون ضدمیکروبی چاهک آگار و دیسک دیفیوژن حاکی از آن بود که سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی سویه *L. rhamnosus* JCM 1136 جداسازی‌شده از ماست محلی، دارای فعالیت ضدمیکروبی بلاتری نسبت به حالت خنثی می باشد. یکی از مکانیسم‌های مهم باکتری‌های پروبیوتیک در مهار رشد باکتری‌های پاتوژن قابلیت تولید اسیدهای آلی می‌باشد، بدیهی است با افزایش اسیدیته سرعت مهار رشد باکتری‌های پاتوژن توسط آن‌ها افزایش می‌یابد [۳۱]. نتایج این آزمون با نتایج وسیعی و همکاران (۲۰۲۰)، مطابقت داشت [۱۲]. این پژوهشگران گزارش کردند سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی سویه *P. acidilactici* VKU2 دارای اثر ضدمیکروبی بیشتری نسبت به سوپرناتانت فاقد سلول خنثی بود. در مطالعه‌ای اثر ضدمیکروبی سویه *L. rhamnosus* CRL 2244 بر باکتری *Acinetobacter baumanni* مورد بررسی قرار گرفت و گزارش شد که سویه پروبیوتیکی مذکور به‌دلیل تولید اسیدهای آلی نظیر اسید لاکتیک و اسید استیک منجر به تخریب دیواره سلولی باکتری پاتوژن شد [۷].

در پژوهش حاضر سویه *L. rhamnosus* JCM 1136 اثر ضدمیکروبی بیشتری بر باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت داشت. مکانیسم فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های پروبیوتیک بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت متفاوت است. باکتری‌های پروبیوتیک بر اساس تولید اسیدهای آلی نظیر هیدروکسیل، هیدروژن پراکسید، دی اکسید کربن و اسیدهای چرب باعث نابودی باکتری‌های پاتوژن گرم منفی می‌شوند. هم‌چنین باکتریوسین تولیدی توسط این باکتری‌ها مؤثر در نابودی باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت است [۸ و ۲۹]. درمطالعه‌ای اثر ضدمیکروبی باکتری *Lactobacillus* جداشده از محصولات لبنی کرمان بر پاتوژن‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت و گزارش شد که قطر هاله عدم‌رشد از ۵/۷ تا ٤٤/۰۲ میلی‌متر متفاوت و بیشترین اثر ضدمیکروبی *Lactobacillus*های جداسازی‌شده بر باکتری گرم مثبت *Bacillus cereus* گزارش شد [٤].

٤- نتیجه‌گیری

امروزه توجه به باکتری‌های پروبیوتیک به‌عنوان نگهدارنده‌های زیستی، دارای فعالیت ضدمیکروبی و دارای پتانسیل بهبود سلامتی انسان در تولید محصولات غذایی مورد توجه جوامع بشری قرار گرفته‌اند. بر اساس نتایج به دست‌آمده از پژوهش حاضر باکتری *L. rhamnosus* JCM 1136 جداسازی‌شده از ماست محلی، قابلیت تحمل و زنده‌مانی در pHهای اسیدی و غلظت‌های مختلف نمک صفراوی را داشت. *L. rhamnosus* JCM 1136 دارای خاصیت هیدروفوبیستی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، قابلیت جذب کلسترول و پتانسیل ضدمیکروبی مطلوب علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا مختلف، عدم تولید متابولیت‌های نامطلوب نظیر آنزیم DNase، آمین‌های بیوژنیک و فاقد فعالیت همولیتیکی بود. باکتری پروبیوتیکی مورد نظر به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج حساسیت نشان داد و درمورد انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به باکتری‌های پاتوژن از سوی باکتری پروبیوتیک مورد نظر نگرانی وجود ندارد. از این رو با افزایش مطالعات برون‌تنی و درون‌تنی نظیر میزان چسبندگی به سلول‌های اپی‌تلیال روده، پتانسیل تولید باکتریوسین، میزان کاهش قند خون و ... می‌توان از باکتری فوق در تولید محصولات غذایی پروبیوتیک استفاده نمود.

٥- تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت مالی طرح پژوهشی به‌شماره ۱٤۰۲/٤۰ که این مقاله مستخرج از آن می‌باشد، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

٦-منابع

[1] Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B. & Hojjati, M. (2021). Investigation of probiotic and technological characteristics of lactic acid bacteria isolated from Behbahan local Dough. *Journal of Food Industry Research*, 21(4): 169-186. [Full text in persian].

[2] Falah, F., Zareie, Z., Vasiee, A., Tabatabaee Yazdi, F., Mortazavi, S. A., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Production of synbiotic ice-creams with *Lactobacillus brevis* PML1 and inulin: functional characteristics, probiotic viability, and sensory properties. Journal of Food Measurement and Characterization, 15(6), 5537-5546.

[3] Falah, F., Vasiee, A., Yazdi, F. T., & Behbahani, B. A. (2021). Preparation and functional properties of synbiotic yogurt fermented with Lactobacillus brevis pml1 derived from a fermented cereal-dairy product. BioMed research international, 2021.

[4] Falah, F., Vasiee, A., Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaee Yazdi, F., & Mortazavi, S. A. (2021). Optimization of gamma-aminobutyric acid production by Lactobacillus brevis PML1 in dairy sludge-based culture medium through response surface methodology. Food science & nutrition, 9(6), 3317-3326.

[5] Vasiee, A., Falah, F., Sankian, M., Tabatabaei-Yazdi, F., & Mortazavi, S. A. (2020). Oral immunotherapy using probiotic ice cream containing recombinant food-grade *Lactococcus lactis* which inhibited allergic responses in a BALB/c mouse model. Journal of Immunology Research, 2020.

[6] Alizadeh Behbahani, b., Naushad, M. & Jovandeh, H. (2022). Evaluating the activity and investigating the characteristics of bacteriocin produced by lactobacillus bacteria isolated from local yogurt of Behbahan city. *Iranian Journal of Food Science and Industry*, 16 (2): 111-120. [Full text in persian].

[7] Rodriguez, C., Ramlaoui, D., Georgeos, N., Gasca, B., Leal, C., Subils, T., Tuttobene, M. R., Sieira, R., Salzameda, N. T., Bonomo, R. A., Raya, R. & Ramirez, M. S. (2023). Antimicrobial activity of the *Lacticaseibacillus rhamnosus* CRL 2244 and its impact on the pHenotypic and transcriptional responses in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*, *Scientiffic Reports*, 13: 14323.

[8] Saboktakin-Rizi, M., Alizadeh Behbahani, B., Mohammad Hojjati, M. & Noshad, M. (2021). Identification 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*, 15: 2615–2624.

[9] Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B. & Fereshteh Falah, F. (2021). Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of *Lactobacillus* strains isolated from Iranian raw milk cheeses. *Food Science & Nutrition*, 00: 1-14.

[10] Vasiee, A., Alizadeh Behbahani, B., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A. & Noorbakhsh, H. (2018). Diversity and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from horreh, a traditional Iranian fermented food. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10 (2): 258–268.

[11] Tabatabai Yazdi, F., Vasiee, A., Alizadeh Behbahani, b. & Mortazavi, S. A. (2016). Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from kimchi produced in Iran. *Journal of Qom University of Medical Sciences*. 11-22. [Full text in persian].

[12] 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*.

[13] Vasiee, A., Falah, F., & Mortazavi, S. A. (2022). Evaluation of probiotic potential of autochthonous lactobacilli strains isolated from Zabuli yellow kashk, an Iranian dairy product. Journal of Applied Microbiology, 133(5), 3201-3214.

[14] Tabatabai Yazdi, F., Vahegi, A., Alizadeh Behbahani, b. & Mortazavi, S. A. (2018). Investigation of the biodiversity of lactic acid bacteria of Mashhad local dough using the 16S rRNA analysis method and determining the probiotic ability of the strains isolated from it. *Journal of Food Science and Technology*, 70 (14): 67-78. [Full text in persian].

[15] Hojjati, M., Alizadeh Behbahani, b. & Falah, F. (2020). Investigation of technological and antimicrobial properties of *Lactobacillus brevis* gp104 strain isolated from Khiki cheese. *Quarterly Journal of Applied Microbiology in Food Industry*, 7 (3): 14-26. [Full text in persian].

[16] Jafari, b., Manadi, A., Rezaei, A., Alizadeh, S., Ahmadizadeh, Ch., Barzegari, A., Pashazadeh, M., & Jafarzadeh, H. (2013). Evaluation of the probiotic potential of *enterococci* isolated from traditional dairy products of Moghan and Meshgin Shahr region. *Veterinary Journal of Islamic Azad University*, *Tabriz Branch*, 6 (1): 1505-1513. [Full text in persian].

[17] Sarabi Jamab, M., Rahnama Wosuqh, p., Kete Shamshiri, m. & Karajhian, R. (2018).

Survival of *Lactobacillus acidopHilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Bifidobacterium bifidium* bacteria as key probiotic bacteria in a simulated gastric and intestinal model. *Journal of Food Science and Technology*, 68 (14): 331-340. [Full text in persian].

[18] Huq, T., Fraschini, C., Khan, A., Riedl, B., Bouchard, J. & Lacroix, M. (2017). Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin. *Carbohydrate Polymers*, 168: 61-69.

[19] Maleki, O., Khaledabad, M. A., Amiri, S., Asl, A. K. & Makouie, S. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in whey protein isolate-crystalline nanocellulose-inulin composite enhanced gastrointestinal survivability. *LWT*, 126: 109224.

[20] Han, Q., Kong, B., Chen, Q., Sun, F. & Zhang, H. (2017). In vitro comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. *Journal of Functional Foods*. 32: 391-400.

[21] Biswal, P., Abhisek Pal, A. & Das, A. P. (2021). Screening for Probiotic Potential of *Lactobacillus Rhamnosus* Strain CRD4. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 11 (3): 10174-10184.

[22] Chehreara Ziabri, A. Tabandeh, F. Utadi, M. Ali Hosseini, A. & Partoinia, A. (2023). Evaluation of the viability of multi-layered microcapsules of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* probiotic strains in simulated stomach and intestinal conditions. *Quarterly Journal of Applied Microbiology in Food Industry*, 8 (1): 58-72. [Full text in persian].

[23] Hajinia, F., Sadeghi, A., Sadeghi Mahonek, A., Khamiri, M., Maqsoodlou, Y. & Muayidi, A. (2021). Evaluation of probiotic and antifungal properties of dominant lactic acid bacteria isolated from oat sour dough, *Journal of Food Health*, 10(1): 45-59. [Full text in persian].

[24] Shamsuddin, B. & Mazharuddin Khan, M. (2019). Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and a commercial probiotic: a comparative in vitro study. *International Journal of Environment, Ecology, Family and Urban Studies (IJEEFUS)*, 9 (4): 59-66.

[25] Fatemizadeh, S. S., Habibi Najafi, M. B. & Nielsen, D. S. (2023). Effect of *Bacillus plantarum* lactiplanta of mutal cheese on the adhesion of cronobacter sakazakii to intestinal cells. *Iran Journal of Food Science and Industry Research*, 19 (4): 557-575. [Full text in persian].

[26] Pieniz, S., Andreazza, R., Anghinoni, T., Camargo, F. & Brandelli, A. (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*. 37: 251e256.

[27] Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., Wang, Y. & Li, W. (2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9 (521).

[28] Wang, H. & Li, L. (2022). Comprehensive evaluation of probiotic property, hypoglycemic ability and antioxidant activity of lactic acid bacteria. *Foods*, 11 (1363): 1-14.

[29] Momenzadeh, S., Jovandeh, H., Alizadeh Behbahani, b. & Barzegar, H. (2021). Evaluation of probiotic and antibacterial properties of *Lactobacillus fermentum* SL163-4. *Journal of Iranian Food Science and Industry Research*, 17 (3): 233-242. [Full text in persian].

[30] Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. & Falah, F. (2019). Inhibition of *Escherichia coli* adhesion to human intestinal Caco-2 cells by probiotic candidate *Lactobacillus plantarum* strain L15. *Microbial Pathogenesis*, 136: 1-7.

[31] Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., Danguleva, A., Ivanova, G., Karapetkov, N. & Rumyan, N. (2015). Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures, *Biotechnol. Equip*, 29: 84e91.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Evaluation of probiotic, antibacterial and safety properties of *Lacticaseibacillus rhamnosus* JCM 1136

Behrooz Alizadeh Behbahani[*1], Hossein Jooyandeh [2], Pegah Namazi[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:2024/2/5
Accepted:2024/3/4

Keywords:

Lactic acid bacteria,

Hemolytic activity,

Antimicrobial activity,

Biogenic amines.

DOI: **10.22034/FSCT.21.149.210.**

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

ABSTRACT

Probiotics are non-pathogenic and beneficial bacteria that contribute to improving digestive health, preventing various types of cancer, and boosting the body's immune system, among other benefits. The aim of this study was to investigate the probiotic potential and antimicrobial activity of the strain *Lacticaseibacillus rhamnosus* JCM 1136. In this research, the probiotic and safety characteristics of the strain were assessed, including acid resistance at pH 2, 3, and 4, bile resistance (0%, 0.3%, 0.5%, and 0.7% bile salt concentration), hydropHobicity, potential for producing DNase enzyme and biogenic amines, hemolytic activity, antioxidant activity, cholesterol absorption capacity, and resistance to common antibiotics. The antimicrobial effect of the strain against pathogenic bacteria (*Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, and *Bacillus cereus*) was evaluated using the agar well diffusion and disk diffusion methods. The results showed that *L. rhamnosus* JCM 1136 exhibited survival capability at different pH levels. The growth of the strain decreased with increasing bile salt concentration. *L. rhamnosus* JCM 1136 showed intermediate to the antibiotic Ampicillin and sensitivity to other antibiotics. The hydropHobicity, antioxidant activity by DPPH and ABTS methods, and cholesterol absorption capacity of the strain were 50.0 ± 50.53%, 50.0 ± 23.44%, 62.0 ± 50.48%, and 43.0 ± 55.41%, respectively. No production of DNase enzyme, biogenic amines, or hemolytic activity was observed in the strain. *L. rhamnosus* JCM 1136 exhibited a greater antimicrobial effect against Gram-positive bacteria. The results indicate that *L. rhamnosus* JCM 1136 possesses desirable probiotic characteristics and can be used in the production of probiotic food products.