



مقاله علمی-پژوهشی

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

بهروز علیزاده بهبهانی\*<sup>۱</sup>، حسین جوینده<sup>۲</sup>، پگاه نمازی<sup>۳</sup>

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

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

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

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>تاریخ های مقاله :</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۶</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۴</p>	<p>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 ضد میکروبی سویه <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> JCM 1136 بود. در این پژوهش، ویژگی‌های پروبیوتیکی و ایمنی سویه شامل مقاومت به اسید در PHهای ۲، ۳ و ۴، 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 ضد میکروبی سویه علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا (<i>Salmonella</i>، <i>Shigella dysenteriae</i>) و <i>Listeria innocua</i>، <i>Staphylococcus aureus</i>، <i>Escherichia coli typhimurium</i> و <i>Bacillus cereus</i>) به روش انتشار در آگار به کمک چاهک و دیسک ارزیابی گردید. نتایج نشان داد سویه <i>L. rhamnosus</i> JCM 1136 توانایی زنده‌مانی در PHهای مختلف را داشت. میزان رشد سویه با افزایش غلظت نمک صفراوی کاهش یافت. <i>L. rhamnosus</i> JCM 1136 نسبت به آنتی‌بیوتیک Ampicillin نیمه‌حساس و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بود. هیدروفوبیستی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش‌های DPPH و ABTS و میزان جذب کلسترول سویه به ترتیب <math>0.50 \pm 0.53</math> درصد، <math>0.50 \pm 0.23</math>، <math>0.62 \pm 0.48</math> درصد و <math>0.43 \pm 0.55</math> درصد بود. هیچگونه تولید آنزیم DNase، آمین‌های بیوژنیک و فعالیت همولیتیک از سویه مشاهده نشد. <i>L. rhamnosus</i> JCM 1136 دارای اثر ضد میکروبی بیشتری بر باکتری‌های گرم مثبت بود. نتایج نشان داد که <i>L. rhamnosus</i> JCM 1136 دارای ویژگی‌های پروبیوتیکی مطلوب می‌باشد و قابلیت کاربرد در تولید محصولات غذایی پروبیوتیکی را نیز دارد.</p>
<p>کلمات کلیدی:</p> <p>باکتری‌های اسید لاکتیک، فعالیت همولیتیک، فعالیت ضد میکروبی، آمین‌های بیوژنیک.</p> <p>DOI:10.22034/FSCT.21.149.223.</p> <p>* مسئول مکاتبات: <a href="mailto:B.alizadeh@asnrukh.ac.ir">B.alizadeh@asnrukh.ac.ir</a></p>	

## ۱- مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به میزان 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 فرآورده‌های 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، میوه‌ها و سبزی‌های تخمیری جداسازی نمود. از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی جداسازده از غذاهای تخمیرشده می‌توان به *Lactobacillus*، *Veissella*، *Leuconostoc*، *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 [۴]. به‌منظور بهره‌مندی از خواص بی‌نظیر پروبیوتیک‌ها باید، میزان مقاومت آن‌ها در شرایط دستگاه گوارشی انسان ارزیابی گردد. به‌عبارتی دیگر پروبیوتیک‌ها باید توانایی حفظ عملکرد خود در دستگاه گوارش انسان را داشته باشند. در نظر گرفتن یک میکروارگانیسم به‌عنوان پروبیوتیک نیازمند انجام آزمون‌های برون‌تنی<sup>۲</sup> و تأیید آن‌ها توسط آزمون‌های

درون‌تنی<sup>۳</sup> 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 ضد میکروبی 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<sup>۴</sup> 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 ۴۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین رشد را دارند. بر اساس پژوهش‌های پیشین، PH بهینه برای رشد *Lactobacillus* حدود ۵/۵ تا ۵/۸ در نظر گرفته شده‌است در حالیکه آن‌ها قادر هستند در PH کمتر از ۵ نیز به‌خوبی رشد کنند [۶]. برخی از گونه‌های *Lactobacillus* در محیط‌های اسیدی، دارای فعالیت ضد میکروبی و دارای توانایی جلوگیری از کلونی‌شدن باکتری‌های بیماری‌زا هستند. *Lactobacillus*‌ها موجب حفظ سلامتی انسان و دارای فعالیت متابولیکی هستند که در سراسر دستگاه گوارش گسترده و ۱ تا ۶ 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 بیورژنیک، پتانسیل آب‌گریزی سویه، پتانسیل همولیتیکی و فعالیت

3. *In vivo*  
4. Microaerophilic

1. Generally Recognized as Safe  
2. *In vitro*

به منظور جداسازی سلول‌های باکتری از محیط کشت، از دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل (Hermle)، ساخت کشور آلمان) با سرعت ۶۰۰۰ g به مدت 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 به صورت کامل حذف گردید. به منظور جداسازی مایع رویی، محتویات درون فالكون سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Biowave II, Wp، ساخت انگلستان) با طول موج ۶۰۰ نانومتر، دارای جذب ۰/۶ در بافر فسفات استریل حل شد. ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده 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 ۱۰<sup>-۹</sup> تهیه شد. پس از کشت سطحی رقت‌های تهیه شده، روی محیط کشت MRS Agar، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط بی‌هوازی به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. با گذشت ۲۴ ساعت کلنی‌های تشکیل شده بر سطح محیط کشت توسط کلنی کانتیر 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 به منظور فعال‌سازی باکتری *L. rhamnosus* JCM 1136 در محیط کشت MRS Broth به مدت 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 به منظور ایجاد شرایط بی‌هوازی در جار بی‌هوازی و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت

ضدمیکروبی باکتری *Lactocaseibacillus 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 به صورت تصادفی جمع‌آوری و تحت شرایط تبرید به آزمایشگاه منتقل شد. به ۵ گرم از نمونه‌ها، ۴۵ mL آب پیتونه ۰/۱ درصد افزوده شد. نمونه‌ها توسط هموژنایزر (Seaward، ساخت آلمان) هموژن شدند. پس از آماده‌سازی رقت‌ها ۱۰<sup>-۱</sup> تا ۱۰<sup>-۶</sup> به صورت سریالی، بر محیط MRS<sup>5</sup> Agar کشت داده شدند. پس از جداسازی سویه از محیط کشت، رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز انجام شد. به منظور شناسایی مولکولی، DNA ژنومی از VI کیت و کشت شبانه باکتری در MRS Broth جداسازی شد. پرایمرهای عمومی ۲۷ FYM (5'-AGA GTT TGATYMTGG CTC AG-3' و 1492 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-) (3' 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. به منظور 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 فالكون استریل افزوده شد.

گرفت. سپس به ۰/۵ mL از سوپرناتانت نمونه‌ها، ۰/۳ mL از اتانول ۹۵ درصد (مرک، ساخت آلمان) و ۲ mL از KOH (مرک، ساخت آلمان) افزوده و در حمام آب‌گرم در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت دید. ۵ mL هگزان (مرک، ساخت آلمان) و ۳ mL آب مقطر افزوده شد. به منظور جداسازی فاز، مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. ۲ mL هگزان در یک میکروتیوپ ریخته شد و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. ۲ mL از معرف O-فتال آلدهید<sup>۶</sup> (سیگماآلدریچ) به مدت ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. پس از گرمخانه‌گذاری ۱ mL اسید سولفوریک غلیظ افزوده شد و در دمای اتاق به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه نگهداری شد. جذب نمونه تلقیح شده و تلقیح نشده در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد جذب غلظت‌های مختلف کلسترو (صفر، ۳/۹۱، ۷/۸۱، ۱۵/۶۳، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ µg/mL) رسم شد. جذب کلسترو از رابطه (۱) به دست آمد:

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

C: غلظت کلسترو (µg/mL) در محیط کشت تلقیح نشده و T غلظت کلسترو (µg/mL) در محیط کشت تلقیح شده.

#### ۲-۶- آزمون سنجش آب‌گریزی سطح سلول<sup>۷</sup>

پتانسیل سویه *L. rhamnosus* JCM 1136 در چسبیدن به حلال غیرقطبی به منظور ارزیابی میزان آب‌گریزی آن مطابق با روش برزگر و همکاران (۲۰۲۱)، انجام شد [۹]. سویه در سانتریفیوژ با ۶۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. پس از دو بار شستشو با بافر فسفات استریل، به منظور رسیدن چگالی نوری سویه‌ها در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ تا ۰/۷ (OD<sub>0</sub>)، سویه‌ها در بافر غوطه‌ور شدند. ۳ میلی‌لیتر از سویه معلق در بافر فسفات استریل به ۱ میلی‌لیتر ان-هگزادکان<sup>۸</sup> (مرک، آلمان) افزوده شدند و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. لوله آزمایش حاوی سویه پس از قرار گرفتن در

گرمخانه‌گذاری شد. پس از اتمام گرمخانه‌گذاری، نتایج به صورت چشمی مشاهده شد.

#### ۲-۴- آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک

ارزیابی میزان حساسیت *L. rhamnosus* JCM 1136 به آنتی‌بیوتیک‌ها مطابق روش طباطبایی یزدی و همکاران (۲۰۱۶)، انجام شد [۱۱]. میزان حساسیت باکتری پروبیوتیکی مورد نظر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی نظیر Nitrofurantion, Clidamycin, Ampicillin, Nitrofurantion, Penicillin, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Tetracyclin و Erythromycin مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور پس از گذشت ۴۸ ساعت، از کشت جامد سویه *L. rhamnosus* و تهیه سوسپانسیون معادل استاندارد نیم مک فارلند، ۱۰۰ میکرولیتر از آن بر محیط MRS Agar کشت سطحی داده شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به کمک پنس استریل روی محیط کشت قرار گرفتند. به منظور ایجاد شرایط بی‌هوازی پلیت‌ها در جار بی‌هوازی قرار گرفتند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت قطر هاله عدم‌رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد ارزیابی قرار گرفت و به صورت مقاوم، نیمه‌حساس و حساس گزارش شد.

#### ۲-۵- آزمون قابلیت حذف کلسترو

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 کلسترو (سیگماآلدریچ) و ۰/۳ درصد نمک صفراوی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. محیط کشت MRS Broth تلقیح نشده به عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط تلقیح شده در سانتریفیوژ با دور rpm ۶۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه قرار

8. n- hexadecane

6. O-Phthalaldehyde

7. Hydrophobicity

۰/۰۰۵ درصد پیریدوکسال-۵- فسفات<sup>۱۵</sup> تلقیح شد. بار دیگر سویه مورد نظر در محیط کشت MRS Broth بدون پیش‌سازهای اسید آمینه و حاوی ۰/۰۶ درصد بروموکرزول بنفش (سیگماآلدریج) 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 1136 *L. rhamnosus* در محیط کشت MRS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از شستشو با بافر فسفات استریل در دو مرتبه، در سانتریفیوژ در دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. محلول DPPH<sup>۱۶</sup> ۰/۲ میلی‌مولار (سیگماآلدریج) به نمونه با نسبت ۱:۲ حجمی-حجمی افزوده شد. در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. محلول ABTS<sup>۱۷</sup> ۷ میلی‌مولار (سیگماآلدریج) با پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی‌مولار (ساخت کره) به نسبت ۱:۱ حجمی-حجمی ترکیب شد. پس از افزودن آب مقطر جذب محلول در ۷۳۴ نانومتر به ۰/۷ تا ۰/۰۱ رسید. ۳۰۰ میلی‌لیتر از نمونه و ۶۰۰ میلی‌لیتر از محلول ABTS به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر برای DPPH و طول موج ۷۳۴ 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:

$$\text{رابطه (۳)} \quad \frac{A}{A_0} \times 100$$

$A_{\text{sample}} - 1 =$  میزان درصد مهار رادیکال‌های آزاد در این فرمول،  $A_{\text{sample}}$  میزان جذب نمونه مورد آزمایش،  $A$  میزان جذب نمونه کنترل.

#### ۱۱-۲- آزمون ضد میکروبی

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

رابطه (۲)

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

#### ۷-۲- آزمون بررسی فعالیت همولیتیک

این آزمون مطابق با روش سبکتکین ریزی و همکاران (۲۰۲۱)، انجام شد [۸]. فعالیت همولیتیک سویه JCM 1136 *L. rhamnosus* 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 به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. تغییرات رنگی ایجادشده مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل هاله شفاف، هاله سبز رنگ یا عدم تشکیل هاله در اطراف کلنی‌ها به ترتیب نشان‌دهنده  $\beta$ -hemolysis،  $\alpha$ -hemolysis و  $\gamma$ -hemolysis است. در این آزمون از باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* به عنوان نمونه کنترل برای  $\beta$ -hemolysis و  $\alpha$ -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<sup>۹</sup> (BA)

این آزمون مطابق با روش برزگر و همکاران (۲۰۲۱)، انجام شد [۹]. توانایی تولید آمین‌های بیوژنیک توسط سویه JCM 1136 *L. rhamnosus* به‌وسیله دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه بر محیط کشت حاوی پیش‌سازهای اسیدهای آمینه نظیر ال-هیستیدین<sup>۱۰</sup>، مونو هیدروکلرید<sup>۱۱</sup>، نمک تیروزین دی‌سدیم<sup>۱۲</sup>، ال-اورنیتین<sup>۱۳</sup> و ال-لیزین<sup>۱۴</sup> انجام شد. یک بار سویه اسید لاکتیک در محیط کشت MRS Broth حاوی ۰/۱ درصد از پیش‌سازهای اسید آمینه ذکر شده و

14. L. lysine  
15. Pyridoxal 5-phosphate  
16. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl  
17. 2,2-azinobis ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid

9. Biogenic amine  
10. L-histidine  
11. Monohydrochloride  
12. Tyrosine di-Sodium Salt  
13. L. ornithine

بی‌هوازی به مدت 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 ضد میکروبی JCM 1136 *L. rhamnosus* به‌روش انتشار در آگار به‌کمک دیسک، مطابق با روش عزیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۲)، انجام شد [۶]. دیسک‌های کاغذی با قطر ۶ mm به مدت 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.

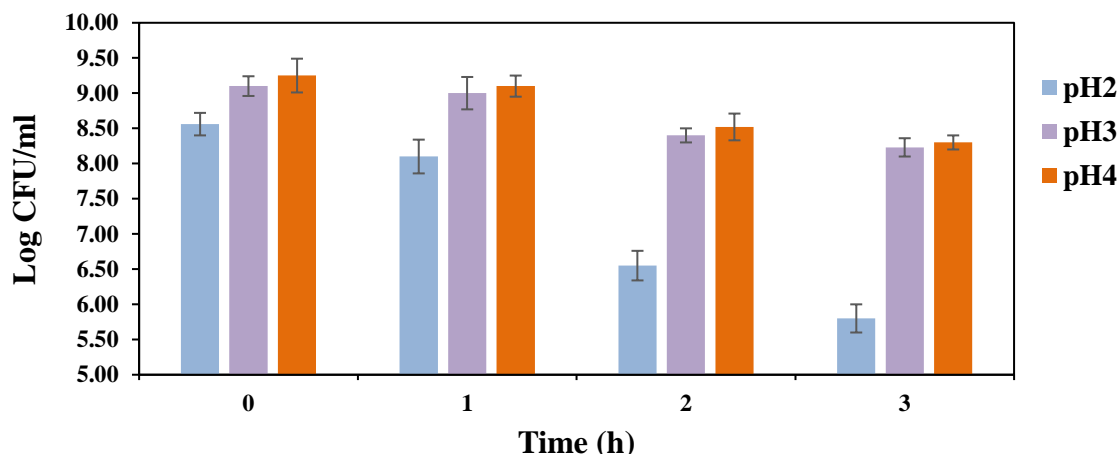
### ۳- نتایج و بحث

پس از جداسازی و شناسایی مولکولی، نتایج ارزیابی زنده‌مانی 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.

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

به‌منظور آزمون ضد میکروبی چاهک آگار مطابق با روش نوشاد و همکاران (۲۰۲۱)، پس از فعال‌سازی سویه‌های بیماری‌زا، سوسپانسیون بر اساس استاندارد نیم مک فارلند به تعداد  $10^8 \times 1/5$  CFU/mL تهیه شد [۱]. سوسپانسیون تهیه‌شده از پاتوژن‌ها روی محیط کشت MHA<sup>18</sup> (مرک، ساخت آلمان) به‌کمک اسپریدر کشت داده شد. در پلیت‌های کشت داده‌شده چاهک‌هایی به قطر ۶ mm به‌کمک انتهای پین استریل ایجاد شد. سویه JCM 1136 *L. rhamnosus* فعال‌شده در محیط کشت MRS Broth در دستگاه سانتریفیوژ (Hermle، ساخت کشور آلمان) با دور ۵۰۰۰g، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به‌منظور تهیه سوپرناتانت فاقد سلول جامد از مایع رویی برداشته و از فیلتر سر سرنگی به قطر 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

18. Muller Hinton Agar



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

صفراوی مقاومت خوبی دارد. در این پژوهش با افزایش درصد نمک صفراوی، رشد باکتری مورد آزمایش به صورت تدریجی کاهش یافت. به صورتی که 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.

نتایج آزمون بررسی مقاومت باکتری JCM 1136 به *L. rhamnosus* به غلظت‌های مختلف نمک صفراوی در جدول ۱، گزارش شده است. نتایج نشان داد JCM 1136 نسبت به غلظت‌های مختلف نمک

**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

که *L. rhamnosus* JCM 1136 نسبت به آنتی‌بیوتیک Ampicillin نیمه‌حساس و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بود.

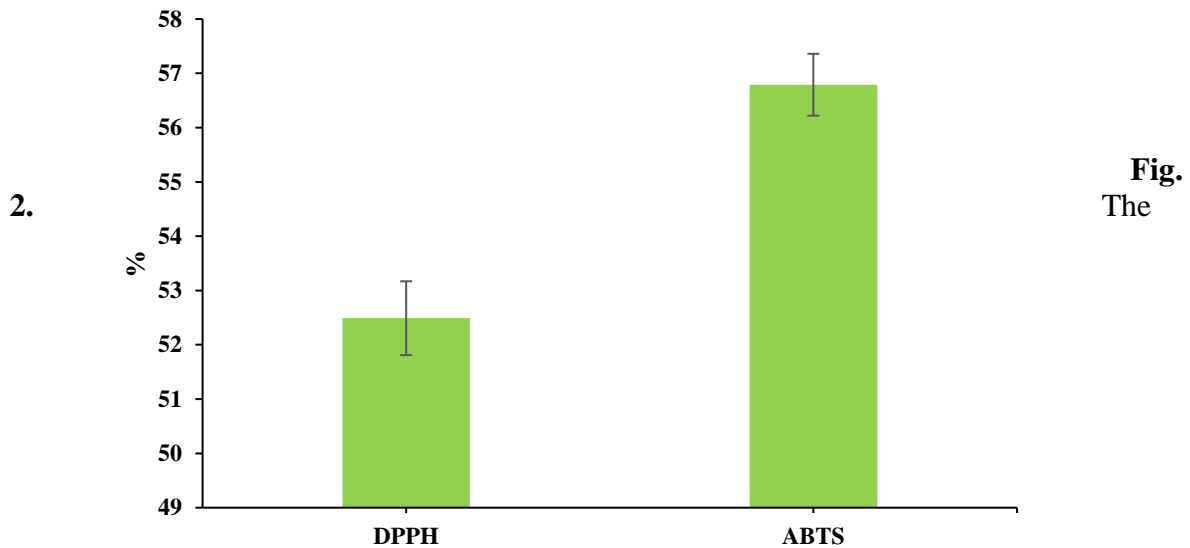
نتایج مربوط به بررسی میزان حساسیت باکتری JCM 1136 *L. rhamnosus* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در جدول ۲، گزارش شده است. نتایج این پژوهش نشان داد

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

Antibiotic	<i>L. JCM 1136 rhamnosus</i>
Ampicillin	Intermediate
Clidamycin	Sensitive
Nitrofurantion	Sensitive
ChlorampHenical	Sensitive
Ciprofloxacin	Sensitive
Penicillin	Sensitive
Tetracyclin	Sensitive
Erythromycin	Sensitive

*L. rhamnosus* JCM 1136 دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود (شکل ۲). در پژوهش حاضر میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS توسط سویه به ترتیب  $44/23 \pm 0/50$  و  $48/50 \pm 0/62$  درصد گزارش شد.

در پژوهش حاضر، نتیجه آزمون بررسی میزان قابلیت جذب کلسترول توسط سویه *L. JCM 1136 rhamnosus*  $41/55 \pm 0/43$  درصد بود. نتیجه آزمون آب‌گریزی سطح سلول توسط سویه  $53/50 \pm 0/50$  درصد بود. هم‌چنین سویه فعالیت همولیتیکی، قابلیت تولید آنزیم DNase و آمین‌های بیوژنیک از خود نشان نداد.



2.

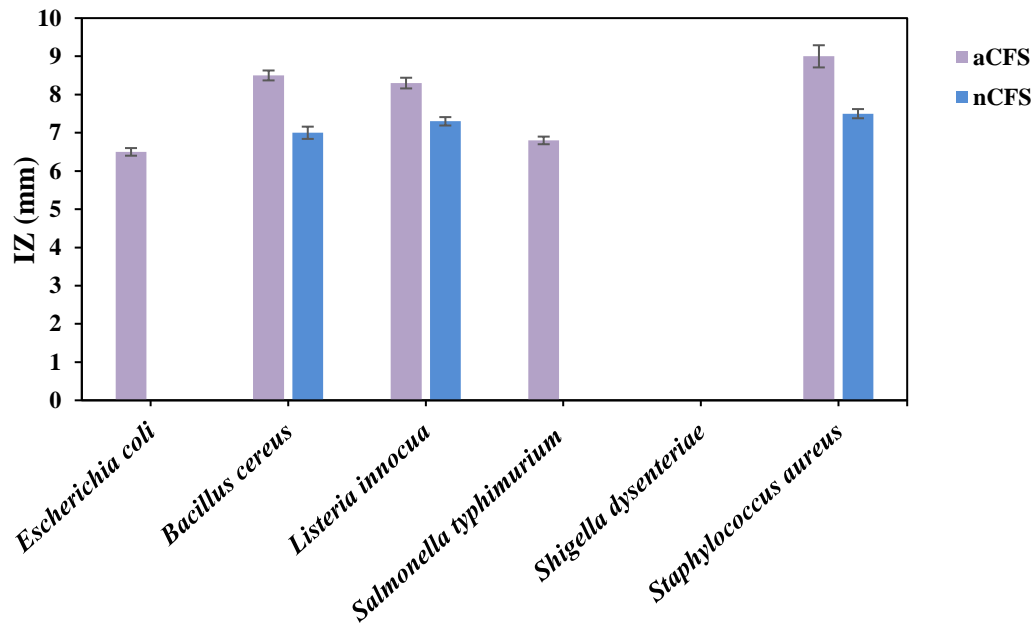
Fig.  
The

#### antioxidant activity (DPPH & ABTS) of *Lacticaseibacillus rhamnosus* JCM 1136.

ضدمیکروبی سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی برای باکتری‌های مذکور به ترتیب  $8/5$ ،  $8/30$ ،  $9$  میلی‌متر بود. در حالت خنثی سویه اثر ضدمیکروبی بر باکتری‌های *Escherichia coli*، *Shigella* و *Salmonella typhimurium dysenteriae* نداشت، درحالی‌که سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی دارای اثر ضدمیکروبی بر باکتری‌های *Salmonella typhimurium* و *Escherichia coli* بود. قطر هاله عدم‌رشد در اثر فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی *L. JCM 1136 rhamnosus* برای باکتری‌های *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* به ترتیب  $6/80$  و  $6/50$  میلی‌متر بود (شکل ۳).

نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی سویه *L. rhamnosus* JCM 1136 بر باکتری‌های پاتوژن بیماری‌زا نظیر *Salmonella*، *Shigella dysenteriae*، *Escherichia coli typhimurium* و *Listeria innocua*، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* به روش انتشار به‌کمک چاهک آگار و دیسک دیفیوژن در شکل ۳ و ۴ 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 *Listeria innocua*، *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* به ترتیب  $7$ ،  $7/30$  و  $7/50$  میلی‌متر بود. در حالی‌که قطر هاله عدم‌رشد در اثر فعالیت





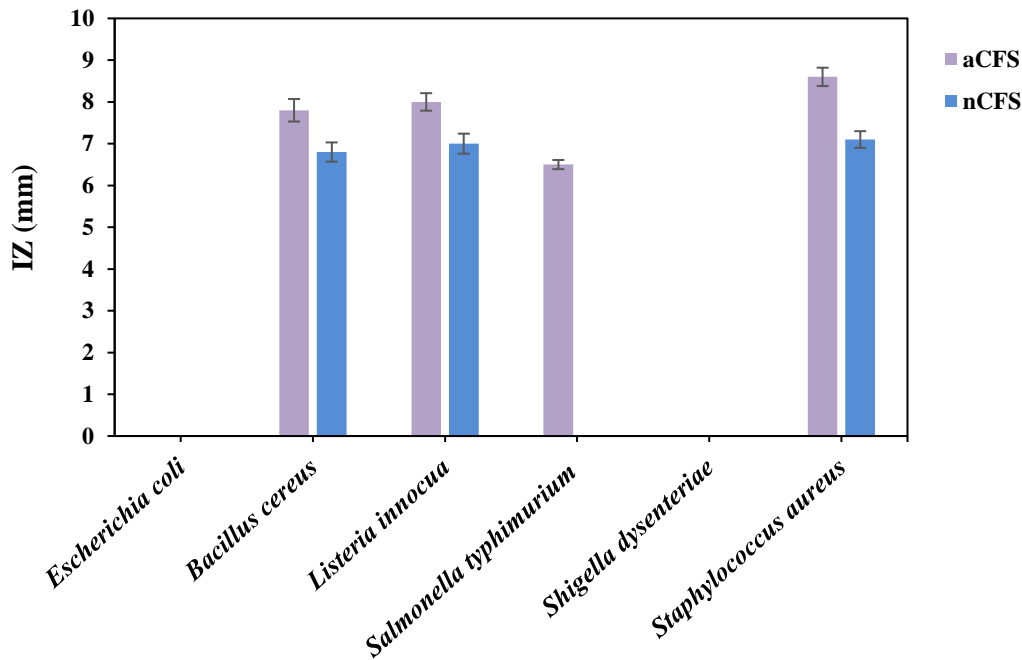
**Fig. 3.** The antimicrobial potency of *Lacticaseibacillus rhamnosus* JCM 1136 using well diffusion agar. The abbreviations aCFS and nCFS stand for acid cell-free supernatants and neutralized cell-free supernatants, respectively.

*Listeria innocua* ، *Bacillus cereus*

*Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhimurium*

قطر هاله عدم رشد برای باکتری های پاتوژن مذکور به ترتیب ۷/۸۰، ۸، ۶/۵۰ و ۸/۶۰ میلی متر بود. سوپرناتانت فاقد سلول *L. rhamnosus* JCM 1136 در حالت اسیدی بر باکتری های *Escherichia coli* و *Shigella dysenteriae* اثر ضد میکروبی نداشت (شکل ۴).

قطر هاله عدم رشد سوپرناتانت فاقد سلول خنثی به روش دیسک دیفیوژن بر باکتری های *Bacillus cereus*، *Staphylococcus aureus* و *Listeria innocua* به ترتیب ۶/۸۰، ۷ و ۷/۱۰ میلی متر بود. سوپرناتانت فاقد سلول خنثی تأثیر ضد میکروبی بر باکتری های *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* نداشت. سوپرناتانت فاقد سلول *L. rhamnosus* JCM 1136 در حالت اسیدی به روش دیسک دیفیوژن دارای اثر ضد میکروبی بر باکتری های



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

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 به وسیله آنزیم‌های آبکافت‌کننده خود موجب کاهش اثرات نامطلوب آن‌ها می‌شوند. کیسه صفرای به وسیله نمک‌های صفراوی در مکانیسم دفاعی اختصاصی و غیراختصاصی روده نقش بسزایی دارد. بر اساس نتایج پژوهش‌های پیشین، میانگین غلظت نمک صفراوی در دستگاه گوارش انسان ۰/۳ درصد وزنی- حجمی می‌باشد [۱۷].

سرایی 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

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 [۱۴]. 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

کروموزومی، انتقال غیرمؤثر آمینوگلیکوزیدها و اصلاح آنزیمی اتفاق بیفتد، گاهی نیز به صورت طبیعی در باکتری‌ها ایجاد می‌شود [۱۵ و ۲۳]. مقاومت باکتری‌های اسید لاکتیک نسبت به آنتی‌بیوتیک ممکن است ناشی از عدم وجود محل هدف آنتی‌بیوتیک در باکتری پروبیوتیک، غیرفعال بودن آنتی‌بیوتیک و ... باشد. بر اساس مطالعه‌ها، 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 به منظور استفاده از این باکتری‌ها در تولید مواد غذایی مختلف و مصرف آن‌ها توسط انسان‌ها وجود دارد. مکانیسم مهم باکتری‌های اسید لاکتیک به منظور مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها حضور پمپ‌هایی می‌باشد که موجب انتشار آنتی‌بیوتیک به خارج از سلول و در نتیجه کاهش غلظت آن در سلول می‌شود [۲۳]. نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن بود که باکتری *L. rhamnosus* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های *Clidamycin*، *Nitrofurantion*، *Chloramphenicol*، *Ciprofloxacin*، *Tetracyclin*، *Penicillin*، *Erythromycin* حساس و نسبت به آنتی‌بیوتیک *Ampicillin* نیمه‌حساس بود. در مطالعه‌ای توسط شمس‌الدین و مظهرالدین خان (۲۰۱۹)، میزان حساسیت سویه‌های *Lactobacillus* جدا شده از غذاهای تخمیری نظیر سویه‌های *Bifidobacterium bifidum* را نسبت به دوازده آنتی‌بیوتیک بررسی و گزارش نمودند سویه‌های جدا سازی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های *Amikacin*، *Clarithromycin*، *Ciprofloxacin*، *Ampiclox*، *Cefuroxime*، *Levofloxacin*، *Cefotaxime*، *Roxithromycin*، *Gentamycin*، *Cefoperazone* و *Cotrimoxazole* حساس بودند [۲۴]. در مطالعه‌ای دیگر میزان حساسیت باکتری‌های *Lactobacillus* و *Pediococcus pentosaceus* *paraplantarum* جدا شده از انواع خمیر ترش را نسبت به آنتی‌بیوتیک *Ampicillin* حساس و نسبت به آنتی‌بیوتیک *Streptomycine*، *Vancomycine*

باکتری‌های زنده *L. rhamnosus* به ۰/۶۵ رسید [۱۷]. در مطالعه دیگر توسط هوک و همکاران (۲۰۱۷)، به منظور افزایش زندهمانی باکتری *L. rhamnosus* در شرایط معده و روده آن‌را با آلزینات، سلولز نانوکپسول و لیستین کپسوله کردند [۱۸]. ملکی و همکاران (۲۰۲۰)، به منظور میکروکپسولاسیون *L. rhamnosus* از ایزوله آب پنیر، اینولین و نانوسلولز کریستالی استفاده کردند [۱۹]. وسیعی و همکاران (۲۰۲۰)، گزارش نمودند سویه *Pediococcus acidilactici* به خوبی 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 جدا شده 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 جدا سازی 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 ۰/۳ درصد نمک صفراوی گزارش شد [۴]. 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* به کمک آلزینات و کیتوزان ریزپوشانی شد. باکتری در برابر آنزیم پپسین با pH ۱/۸ و آنزیم پانکراتین با PH ۶/۸ مقاوم گزارش شد و تعداد باکتری‌های زنده پس از عبور از سیستم شبیه‌سازی شده معده در حد قابل قبول  $10^6$  CFU/ml تعیین شد [۲۲].

امروزه مقاومت باکتری‌های مختلف به آنتی‌بیوتیک‌ها موجب نگرانی جوامع بشری شده است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در حالیکه ممکن است در اثر مکانیسم‌های ژنتیکی نظیر انتقال ژن از طریق پلاسمیدها، جهش‌های

هیدروفوبیستی پس از ترکیب کردن سوسپانسیون میکروبی و محلول غیرقطبی و اندازه‌گیری OD<sub>600</sub> سطح آبی، پیش و پس از افزودن محلول محاسبه می‌شود [۱۲]. در پژوهش حاضر میزان آب‌گریزی سویه *L. JCM 1136 rhamnosus*  $0/50 \pm 53/50$  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. CRD 4 rhamnosus* در حضور زایلن  $1/10 \pm 70$  درصد، در حضور تولوئن  $1/23 \pm 70$  درصد و در حضور کلروفرم  $1/0 \pm 57$  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<sup>۲۴</sup>، نیروی واندروالسی، حرکت براونی<sup>۲۵</sup>، 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 *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 ریبونوکلاز<sup>۲۶</sup> موجب آب‌کافت پیوندهای فسفودی

*Ciprofloxacin* و *Acid nalidixique* 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*، *Ampicillin*، *Amoxicillin*، *Chloramphenicol* و *Tetracyclin* دارای حساسیت است [۲۱]. نتایج آن‌ها با نتایج پژوهش حاضر شباهت داشت.

در حالیکه وجود کلسترویل برای برخی از بافت‌های بدن ضروری است، اما افزایش کلسترویل در خون انسان موجب بیماری‌های قلبی، عروقی و ... می‌شود. باکتری‌های پروبیوتیک قابلیت جذب کلسترویل 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 کلسترویل را از خود نشان داده است. به‌طور کلی میزان کاهش کلسترویل توسط پروبیوتیک‌ها مرتبط با نوع سویه، میزان تولید ترکیباتی که منجر به مهار آنزیم ۳-هیدروکسی ۳-متیل گلو تاریل کوآنزیم A<sup>۱۹</sup>، میزان فعالیت هیدرولاز نمک صفراوی و میزان توانایی جذب کلسترویل 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<sup>۲۰</sup>، n-هگزادکان<sup>۲۱</sup>، کلروفرم<sup>۲۲</sup> و اتیل استات<sup>۲۳</sup> استفاده کرد.

23. Ethyl acetate  
24. Pleomorphism  
25. Brownian movement  
26. Deoxyribonuclease

19. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A  
20. Xylene  
21. n-Hexadecan  
22. Chloroform

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 عدم وجود هیستامین و تیرامین در محصولات غذایی پروبیوتیکی به منظور 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 به وقوع 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 به علت میزان بالای  $D-\beta-1/3$ -گلوکان<sup>۲۹</sup> و سایر  $\beta$ -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 پژوهش‌های پیشین *Enterococcus durans* به علت فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا و قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد ABTS به عنوان آنتی‌اکسیدان در محصولات غذایی استفاده شود [۲۶]. یون آهن موجود در ترکیباتی نظیر EDTA<sup>۳۰</sup> و باتوفانتروپین دی‌سولفیک اسید<sup>۳۱</sup> (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، آگرو

استر در ساختار DNA می‌شود. در برخی محصولات غذایی برای مثال در شیر خشک نوزادان، آرژنین به عنوان 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 به منظور 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 به ویژه *Enterococcus* 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، به عنوان 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 باشد از این رو شناسایی و تعیین ویژگی‌های سویه‌های باکتریایی برای استفاده به عنوان سویه‌های پروبیوتیکی حائز اهمیت است [۲۵]. آمین‌های بیوژنیک توسط آمیناسیون<sup>۲۷</sup> و ترانس آمیناسیون<sup>۲۸</sup> آلدئیدها و کتون‌ها یا در اثر دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه به وجود می‌آیند. آمین‌های بیوژنیک را می‌توان در محصولات غذایی حاوی پروتئین و اسید آمینه‌های آزاد که تحت فرآیندهای

30. Ethylene Diamine Tetraacetic Acid  
31. Bathophenanthroline disulfonic acid

27. Amination  
28. Transamination  
29.  $\beta$ - D- glucan

بود قطر هاله عدم رشد پاتوژن‌ها توسط سویه مورد نظر در روش چاهک از صفر تا ۹ میلی‌متر متفاوت بود. بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی بود. قطر هاله عدم رشد پاتوژن‌ها نسبت به سوپرناتانت فاقد سلول خنثی سویه *L. JCM 1136* برای باکتری‌های بیماری‌زا گرم مثبت *Staphylococcus aureus*  $0.29 \pm 0.50$  میلی‌متر، *Bacillus cereus*  $0.27 \pm 0.30$  میلی‌متر و *Listeria innocua*  $0.23 \pm 0.07$  میلی‌متر بود. قطر هاله عدم رشد پاتوژن‌ها نسبت به سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی سویه *JCM 1136* *L. rhamnosus* برای باکتری‌های بیماری‌زا گرم مثبت *Bacillus cereus*، *Staphylococcus aureus* و *Listeria innocua* به ترتیب  $0.27 \pm 0.09$ ،  $0.15 \pm 0.80$  و  $0.19 \pm 0.30$  میلی‌متر بود. مقاوم‌ترین پاتوژن در برابر اثر ضد میکروبی سوپرناتانت فاقد سلول باکتری گرم منفی *Shigella dysenteriae* بود، بطوریکه هیچگونه اثر ضد میکروبی مشاهده نشد. قطر هاله عدم رشد سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی برای باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* به ترتیب  $0.13 \pm 0.70$  و  $0.12 \pm 0.68$  میلی‌متر بود. قطر هاله عدم رشد سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی و خنثی سویه *L. rhamnosus* *JCM 1136* به روش دیسک دیفیوژن، از صفر تا  $0.60 \pm 0.80$  میلی‌متر متفاوت بود. در این روش نیز، بیشترین میزان فعالیت ضد میکروبی مربوط به سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی بود. حساس‌ترین پاتوژن‌ها نسبت به سوپرناتانت فاقد سلول خنثی به روش دیسک دیفیوژن، باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و *Listeria innocua* و به ترتیب با قطر هاله عدم رشد  $0.25 \pm 0.10$ ،  $0.13 \pm 0.07$  و  $0.18 \pm 0.68$  میلی‌متر بود. حساس‌ترین سویه پاتوژن‌ها نسبت به سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی باکتری‌های بیماری‌زا گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و *Listeria innocua* با قطر هاله

پلی‌ساکاریدهای باکتریایی، منگنز، گلوکاتیون<sup>۳۲</sup> (GSH)، بوتیرات<sup>۳۳</sup>، فولات<sup>۳۴</sup> و آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز<sup>۳۵</sup> 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]. به منظور ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی سویه *L. JCM 1136* *rhamnosus* از آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS استفاده شد. مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS توسط سویه مورد نظر به ترتیب  $0.50 \pm 0.44/23$  و  $0.62 \pm 0.48/50$  درصد بود. در پژوهشی یانگ و لی (۲۰۲۲)، گزارش دادند که میزان مهار رادیکال‌های DPPH توسط باکتری *L. rhamnosus*  $0.2/73$  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  $0.55 - 0.68$  درصد و میزان مهار رادیکال‌های آزاد ABTS توسط باکتری‌های اسید لاکتیک  $0.69/19 - 0.26/86$  درصد گزارش دادند [۱۳].

پژوهشگران علت فعالیت ضد میکروبی 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 پلیمرز و tRNA سنتتاز در آن‌ها نیز می‌شود [۲۳]. در پژوهش حاضر فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی و خنثی *L. rhamnosus* *JCM 1136* علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا به روش انتشار در آگار به کمک چاهک و دیسک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن

34. Folate

35. Super Oxide Dismotase

32. Glutathione

33. Butyrate

مثبت است [۸ و ۲۹]. در مطالعه‌ای اثر ضد میکروبی باکتری *Lactobacillus* جدا شده از محصولات لبنی کرمان بر پاتوژن‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت و گزارش شد که قطر هاله عدم‌رشد از ۵/۷ تا ۴۴/۰۲ میلی‌متر متفاوت و بیشترین اثر ضد میکروبی *Lactobacillus* جداسازی شده بر باکتری گرم مثبت *Bacillus cereus* گزارش شد [۴].

#### ۴- نتیجه‌گیری

امروزه توجه به باکتری‌های پروبیوتیک به‌عنوان نگهدارنده‌های زیستی، دارای فعالیت ضد میکروبی 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. JCM 1136 rhamnosus* جداسازی شده از ماست محلی، قابلیت تحمل و زنده‌مانی در pHهای اسیدی و غلظت‌های مختلف نمک صفاوی را داشت. *L. rhamnosus JCM 1136* دارای خاصیت هیدروفوبیستی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، قابلیت جذب کلسترول و پتانسیل ضد میکروبی 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 در مورد 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.

#### ۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت مالی طرح پژوهشی به شماره ۱۴۰۲/۴۰ که این مقاله مستخرج از آن می‌باشد، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

عدم رشد به ترتیب  $۷/۸۰ \pm ۰/۱۱$  و  $۸ \pm ۰/۱۴$ ،  $۸/۶۰ \pm ۰/۲۲$  میلی‌متر بود. سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی و خشتی *JCM 1136 rhamnosus L.* اثر ضد میکروبی بر باکتری‌های گرم منفی *Shigella dysenteriae* و *Escherichia coli* نداشت. باکتری گرم منفی *Salmonella typhimurium* نسبت به سوپرناتانت فاقد سلول خشتی مقاوم بود در حالیکه قطر هاله عدم‌رشد آن در حالت اسیدی  $۶/۵۰ \pm ۰/۱۰$  میلی‌متر بود. نتایج آزمون ضد میکروبی چاهک آگار و دیسک دیفیوژن حاکی از آن بود که سوپرناتانت فاقد سلول اسیدی سویه *L. rhamnosus JCM 1136* جداسازی شده از ماست محلی، دارای فعالیت ضد میکروبی بالاتری نسبت به حالت خشتی می‌باشد. 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 ضد میکروبی بیشتری نسبت به سوپرناتانت فاقد سلول خشتی بود. در مطالعه‌ای اثر ضد میکروبی سویه *L. rhamnosus CRL 2244* بر باکتری *Acinetobacter baumannii* مورد بررسی قرار گرفت و گزارش شد که سویه پروبیوتیکی مذکور به دلیل تولید اسیدهای آلی نظیر اسید لاکتیک و اسید استیک منجر به تخریب دیواره سلولی باکتری پاتوژن شد [۷].

در پژوهش حاضر سویه *L. JCM 1136 rhamnosus* اثر ضد میکروبی بیشتری بر باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت داشت. مکانیسم فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک بر باکتری‌های 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

## ۶-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., Tabatabaee-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*. *Scientific 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., Ahmadzadeh, 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 bifidum* 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., Frascini, 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 Ziabari, 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] Fatemzadeh, 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., Andrezza, 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.



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

**Behrooz Alizadeh Behbahani**<sup>\*1</sup>, Hossein Jooyandeh<sup>2</sup>, Pegah Namazi<sup>3</sup>

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	ABSTRACT
<p><b>Article History:</b> Received:2024/2/5 Accepted:2024/3/4</p>	<p>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 <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> 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 (<i>Shigella dysenteriae</i>, <i>Salmonella typhimurium</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Listeria innocua</i>, and <i>Bacillus cereus</i>) was evaluated using the agar well diffusion and disk diffusion methods. The results showed that <i>L. rhamnosus</i> JCM 1136 exhibited survival capability at different pH levels. The growth of the strain decreased with increasing bile salt concentration. <i>L. rhamnosus</i> 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 <math>50.0 \pm 50.53\%</math>, <math>50.0 \pm 23.44\%</math>, <math>62.0 \pm 50.48\%</math>, and <math>43.0 \pm 55.41\%</math>, respectively. No production of DNase enzyme, biogenic amines, or hemolytic activity was observed in the strain. <i>L. rhamnosus</i> JCM 1136 exhibited a greater antimicrobial effect against Gram-positive bacteria. The results indicate that <i>L. rhamnosus</i> JCM 1136 possesses desirable probiotic characteristics and can be used in the production of probiotic food products.</p>
<p><b>Keywords:</b></p> <p>Lactic acid bacteria, Hemolytic activity, Antimicrobial activity, Biogenic amines.</p>	
<p><b>DOI:</b> 10.22034/FSCT.21.149.210. *Corresponding Author E-Mail: <a href="mailto:B.alizadeh@asnrukh.ac.ir">B.alizadeh@asnrukh.ac.ir</a></p>	