مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال نوزدهم، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۳، صفحات ۴۷-۳۵

جداسازی و شناسایی سویه *Lactococcus lactis* M69 از ماست محلی و ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی، ضدمیکروبی و ایمنی آن

بهروز علیزاده بهبهانی[۱]، محمدامین مهرنیا[۲]، حسین جوینده[۳]، فاطمه مطوری[۴]

۱ – نویسنده مسئول: دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
پست الکترونیکی: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

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

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

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۱۲

چکیده

سابقه و هدف: طی سالیان اخیر، محصولات تخمیری به دلیل دارا بودن ارزش تغذیه‌ای بالا و اثرات زیستی مثبت بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. باکتری‌های اسید لاکتیک، عمده‌ترین و مهم‌ترین گروه باکتریایی موجود در این دسته محصولات هستند. پژوهش حاضر به منظور ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی، ضدمیکروبی و ایمنی سویه *Lactococcus lactis* M69 جدا شده از ماست محلی انجام شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا سویه مورد نظر از نظر ویژگی‌های پروبیوتیکی نظیر مقاومت به اسید (pH ۳، ۴ و ۵)، مقاومت به صفرا (۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷٪)، خاصیت هیدروفوبیستی، جذب کلسترول ارزیابی شد. تولید آمین بیوژنیک، عدم فعالیت DNase و فعالیت همولیتیک نیز بررسی گردید. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سویه جداسازی شده (ABTS و DPPH) تعیین شد. فعالیت ضدمیکروبی سویه به روش دیسک دیفیوژن آگار و نفوذ در چاهک آگار، علیه ۶ باکتری بیماری‌زا غذازاد (*Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Shigella dysenteriae*، *Listeria monosytogenes*، *Salmonella typhimurium* و*Bacillus cereus*) مورد بررسی قرار گرفت. مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی (Vancomycin، Nitrofurazone، Chloramphenicol، Ciprofloxacin، Penicillin، Nalidixic، Imipenem، Gentamicin) نیز بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج آزمون مقاومت به اسید نشان داد که با کاهش pH درصد زنده‌مانی بسیار کاهش می‌یابد. ۶۹٪ زنده‌مانی در pH=3 و ۹۹٪ زنده‌مانی در pH=5 مشاهده شد. سویه مذکور در تمامی غلظت‌های نمک صفراوی رشد داشت. خاصیت هیدروفوبی ۰/۴۷ ±۵۶/۳۵٪ بود. سویه فعالیت همولیتیک، DNase و تولید آمین بیوژنیک نشان نداد. میزان جذب کلسترول ۰/۵۶ ±۴۰/۴۰٪، میزان مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS به ترتیب معادل ۰/۴۹ ±۳۳/۸۰٪ و ۰/۴۱ ±۳۸/۵۰٪ به دست آمد. نتایج حاصل از اثر ضدمیکروبی نشان داد که در هر دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک سوپرناتانت اسیدی فاقد سلول (aCFS) و سوپرناتانت خنثی شده فاقد سلول (nCFS) بیشترین اثر ضدمیکروبی را روی *B. cereus* داشتند. *L. lactis* M69 نسبت به Chloramphenicol بیشترین حساسیت را نشان داد.

نتیجه‌گیری: مطابق با نتایج به دست آمده سویه *L. lactis* M69 پتانسیل پروبیوتیکی و تکنولوژیکی قابل قبولی جهت استفاده در محصولات غذایی دارد.

واژگان کلیدی: *لاکتوکوکوس لاکتیس*، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، پروبیوتیک، اثر ضدمیکروبی

پیام‌های اصلی

- *Lactococcus lactis* M69 توانست pHها و درصدهای مختلف نمک‌های صفراوی را تحمل کند و نسبت به شرایط دستگاه گوارش سازگاری نشان دهد.
- *L. lactis* M69 فاقد فعالیت همولیتیکی، DNase و تولید آمین بیوژنیک بود.
- *L. lactis* M69 پتانسیل پروبیوتیکی قابل قبولی جهت استفاده در محصولات غذایی دارد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-10]

[DOI: 10.61186/nsft.19.4.35]

• مقدمه

طی سال‌های اخیر، محصولات تخمیری به دلیل دارا بودن ارزش تغذیه‌ای بالا و اثرات زیستی مثبت بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. باکتری‌های اسید لاکتیک، عمده‌ترین و مهم‌ترین گروه باکتریایی موجود در این دسته محصولات هستند که برای فرآوری انواع محصولات لبنی، گوشتی، سبزیجات و غلات استفاده می‌گردند و توانایی متابولیزه کردن مواد سازنده ماتریکس غذا و تولید ترکیباتی همانند اسیدهای آلی، آلدئیدها، الکل‌ها، استرها، پپتیدها، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب را دارند. مطالعه خواص تکنولوژیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از منابع مختلف (مانند گیاهان، پنیر و معده انسان) نشان دهنده ویژگی‌های بالقوه این گروه میکروبی جهت استفاده در بسیاری از تولیدات غذایی تخمیری از جمله محصولات لبنی می‌باشد. این دسته از باکتری‌ها ویژگی‌های مهم تکنولوژیکی نظیر اتولیتیک، لیپولیز، پروتئولیز و تجزیه سیترات را داشته که در تولید ترکیبات و متابولیت‌های میکروبی و ایجاد عطر و طعم مطلوب فرآورده‌های لبنی نقش مهمی دارند (۲، ۱). به علاوه، فعالیت ضدمیکروبی و ارزیابی ایمنی باکتری، دو ویژگی مهم و حیاتی باکتری‌های مفید برای انسان هستند. فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک سبب کنترل فرآیند تخمیر و افزایش زمان ماندگاری محصولات می‌گردد (۳). علاوه بر موارد ذکر شده، بعضی گونه‌های این خانواده، پروبیوتیک هستند؛ پروبیوتیک ها نوعی مکمل غذایی هستند که از باکتری‌ها و قارچ‌های بالقوه مفید تشکیل شده‌اند. تفاوت پروبیوتیک‌ها با سایر ریززنده‌ها مرتبط با خواص سلامت‌بخشی همچون ضدسرطان‌زایی، ضدجهش‌زایی، محرک سیستم ایمنی، کاهندگی کلسترول سرم، افزایش ارزش تغذیه‌ای، درمان انواع اسهال، عفونت‌های دستگاه گوارش و دستگاه ادراری می‌باشد (۴). این باکتری‌ها از طرف اتحادیه اروپا و سازمان غذا و داروی آمریکا به عنوان باکتری‌های بی‌خطر شناخته شده‌اند و از نظر درجه غذایی به طور گسترده‌ای در صنایع تخمیر مواد غذایی به ویژه پنیر، ماست و ... مورد استفاده قرار می‌گیرند. باکتری‌های لاکتیک اسید شامل جنس‌های مختلفی از جمله: *Lactobacillus*، *Lactococcus*، *sterptococcus*، *Carnobacterium* و *Enterococcus* می‌باشند. *Lactococcus lactis* بهترین گونه در میان لاکتوکوک‌ها و پرمصرف‌ترین باکتری در میان باکتری‌های تخمیرکننده مواد غذایی در سراسر جهان است (۵).

با توجه به افزایش مصرف مواد لبنی صنعتی، کاهش یا حذف سویه‌های پروبیوتیک امکان‌پذیر است. از طرفی، جداسازی و شناسایی آن‌ها در محصولات لبنی سنتی و تلاش برای تولید بیشتر و استفاده در فراورده‌های لبنی، با توجه به اهمیت در ارتقای سلامتی عمومی، امری مهم تلقی می‌شود (۶). در پژوهش حاضر، ویژگی‌های پروبیوتیکی، ضدمیکروبی و ایمنی سویه *L. lactis* M69 جدا شده از ماست محلی مورد بررسی قرار گرفت.

• مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی سویه *L. lactis* M69

در این مطالعه مطابق با پژوهش Saboktakin-Rizi و همکاران (۲۰۲۱) جداسازی و شناسایی سویه انجام پذیرفت. نمونه‌ها به صورت تصادفی از بازار محلی جمع‌آوری و تحت شرایط یخچالی به آزمایشگاه منتقل شدند. مقدار مشخصی از نمونه (۵ گرم) به ۴۵ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد اضافه و نمونه‌ها هموژنیزه شدند، سپس از رقت‌های تهیه شده (10^{-1}-10^{-6}) روی محیط MRS آگار کشت داده شد. در مرحله بعد، سویه کشت شده تحت رنگ‌آمیزی گرم و کاتالاز قرار گرفت. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت Genomic DNA isolation VI (دنا زیست آسیا، ایران) انجام و به مدت یک شب در محیط MRS براث کشت شدند. پس از ایجاد رسوب در میکروتیوب‌های حاوی سوسپانسیون میکروبی و حل نمودن در ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات و اضافه کردن محلول آنزیمی برای حصول حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، مطابق با پروتکل شرکت سازنده عمل گردید. از پرایمرهای Universal که طراحی آن‌ها بر مبنای نواحی حفظ شده 16S rRNA است، استفاده شد و واکنش PCR در کیت PCR و حجم نهایی ۲۵/۱۵ میکرولیتر انجام گردید.میکروتیوب حاوی PCR در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. طبق نتایج به دست آمده، ایزوله با خواص گرم مثبت و کاتالاز منفی با میزان شباهت ۹۸ درصد متعلق به سویه *L. lactis* M69 بود (۷).

ویژگی‌های پروبیوتیکی سویه *L. lactis* M69

آزمون مقاومت به اسید و نمک‌های صفراوی

آزمون مقاومت به اسید مطابق با روش مومن‌زاده و همکاران (۱۴۰۰) انجام شد. ابتدا سویه *L. lactis* M69 در محیط MRS براث تلقیح و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شد. پس از ۲۴ ساعت، ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی به لوله فالکون استریل منتقل گردید.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-10]

[DOI: 10.61186/nsft.19.4.35]

سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار (Hermle، آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵۰۰۰ g از محیط کشت جدا شدند. رسوب باکتری جهت حذف کامل محیط کشت، با محلول بافر فسفات استریل (شرکت Bioidea) شستشو گردید. مجدد محتویات فالکون سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب تشکیل شده در بافر فسفات حل گردید به طوری‌که توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Biowave II, Wp، انگلستان) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب ۰/۶ رویت شود. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده در ۴ میکروتیوب دارای ۴۵۰ میکرولیتر بافر فسفات اسیدی دارای pHهای متفاوت (۵-۳) کشت شده و بعد از ۲/۵ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی، رقت‌های پیاپی (تا 10^{-10}) از نمونه تهیه و از آن‌ها بر محیط MRS آگار کشت سطحی داده شد. پلیت‌ها در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. درصد زنده‌مانی سویه، بعد از ۲۴ ساعت با شمارش کلنی‌های تشکیل شده روی محیط کشت توسط کلنی کانتر و مقایسه با نمونه کنترل محاسبه گردید (۸).

جهت انجام آزمون مقاومت به صفرا، پس از فعال‌سازی سویه در محیط MRS براث (۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۵ دقیقه در دور g ۹۰۰۰و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سوسپانسیون میکروبی سانتریفیوژ شد. پس از حذف محیط کشت، رسوب باقی‌مانده با محلول فسفات بافر شستشو و مجدد سانتریفیوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده روی محیط MRS آگار حاوی ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ درصد نمک صفراوی کشت داده شد. به مدت ۲۴ ساعت پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط بی‌هوازی قرار گرفتند. پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری، نتایج به صورت چشمی مشاهده شد (۸).

هیدروفوبیستی سطح سلول

تمایل باکتری‌ها برای اتصال به حلال‌های غیرقطبی با شاخص هیدروفوبیستی سطحی بیان می‌گردد. هیدروفوبیستی بالا، توانایی نقل مکان از محیط آبی به محیط آلی یا غیرقطبی را به باکتری داده و باکتری قادر است به ذرات هیدروکربنی روی سلول یا سطوح مخاطی متصل شود. کشت شبانه‌ای از باکتری‌ها در rpm ۶۰۰۰ به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از آن با استفاده از بافر فسفات استریل و سرد شسته شدند و مجدداً سوسپانسیون تهیه گردید. OD در ۶۰۰ نانومتر روی ۰/۶ تنظیم شد (A_1). از سوسپانسیون هر باکتری ۴ میلی‌لیتر با ۲ میلی‌لیتر ان-هگزادکان مخلوط و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. پس از ۱ ساعت قرارگیری در دمای محیط و انتقال باکتری بین دو فاز، جذب محلول آبی در ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید (A_2) (۹). با معادله زیر هیدروفوبیستی محاسبه شد:

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

آزمون DNase، فعالیت همولیتیک و آمین بیوژنیک

جهت انجام تست فعالیت DNase، ابتدا سویه مورد نظر به صورت خطی بر محیط DNase کشت داده شد و تولید آنزیم پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل هاله شفاف و صورتی رنگ اطراف کلونی‌ها، به عنوان پاسخ مثبت گزارش گردید (۱۰).

از طریق کشت خطی بر محیط Tryptic Soy Agar (مرک، آلمان) با ۷ درصد حجمی/حجمی خون گوسفند، بررسی فعالیت همولیتیک سویه‌ها انجام پذیرفت. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. 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 باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* به عنوان نمونه کنترل برای β-hemolysis و α-hemolysis استفاده شد (۱۱، ۱۰).

مطابق با مطالعه برزگر و همکاران (۲۰۲۱) محیط کشت حاوی آمینواسیدهای پیش‌ساز از جمله ال-هیستیدین مونوهیدروکلرید، نمک تیروزین دی سدیم، ال-اورنیتین مونوهیدروکلرید ال لیزین مونوهیدروکلرید طراحی شد و جهت تشخیص توانایی سویه‌ها برای تولید آمین بیوژنیک با دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه مورد استفاده قرار گرفت. *L. lactis* M69 روی محیط کشت MRS براث دارای ۰/۱ درصد از هر اسیدآمینه پیش‌ساز و ۰/۰۰۵ درصد پیریدوکسال ۵-فسفات کشت داده شد. جهت تشخیص سویه از محیط MRS آگار دارای اسید آمینه و فاقد آن (حاوی ۰/۰۶ درصد بروموکرزول بنفش (سیگما) استفاده گردید. پس از ۲ الی ۵ روز گرمخانه‌گذاری، نتیجه مثبت با ایجاد رنگ بنفش در کلونی‌های اطراف نشان داده می‌شود (۱۲).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

در روش ABTS، در ابتدا با مخلوط نمودن ۷ میلی‌مولار ABTS (سیگما، آلدریچ) و ۲/۴۵ میلی‌مولار پرسولفات پتاسیم (Daejung chemical and metals, Siheung, Korea) محلول ABTS تهیه گردید. ۶۰۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده و ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه ترکیب و ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شدند.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-10]

[DOI: 10.61186/nsft.19.4.35]

جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر خوانده شده و فعالیت مهار رادیکال به روش ABTS از رابطه زیر محاسبه گردید (۱۳).

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

اثر سویه مذکور بر فعالیت مهار رادیکال مطابق با روش علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۳) بررسی شد. سویه در محیط MRS آگار کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. با استفاده از بافر فسفات سالین (PBS) نمونه‌ها ۲ بار شسته و با سرعت 5000rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام پذیرفت. جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۲و۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH)، ۲ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (۰/۱۴ میلی‌مولار) و ۲ میلی‌لیتر از نمونه باکتری با هم ادغام شده و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تاریکی قرار گرفتند. میزان جذب در طول موج ۵۷۱ نانومتر مشخص‌کننده ظرفیت جداسازی برای خنثی نمودن رادیکال‌های DPPH است (۱۱).

جذب کلسترول

نمک صفراوی ۰/۳ درصد و پلی‌اکسی اتانیل-کلسترول سبکات به محیط MRS براث حاوی ۱۰۰ میکرولیتر کلسترول اضافه شد. نمونه به مدت ۲۴ ساعت در محیط بی‌هوازی و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه براث فاقد کشت به عنوان کنترل درنظر گرفته شده بود (۱۱).

مقاومت به آنتی‌بیوتیک و فعالیت ضدمیکروبی

جهت بررسی و تشخیص حساسیت یا مقاومت *L. lactis* M69 نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی، سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند از محیط کشت جامد میکروارگانیسم تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن بر محیط MRS آگار کشت داده شد. در مرحله بعد، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک، Vancomycin، Nitrofurazone، Chloramphenical، Ciprofloxacin، Penicillin، Nalidixic، Imipenem، Gentamicin توسط پنس استریل روی محیط کشت قرار داده شد. پلیت‌ها در جار بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک توسط خط‌کش اندازه‌گیری و نتیجه بر حسب میلی‌متر گزارش شد (۸).

جهت بررسی و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی *L. lactis* M69 ابتدا سویه مورد نظر، روی محیط کشت MRS آگار کشت داده شده و ۲۴ ساعت در جار بی‌هوازی انکوبه شد. سپس، کلونی‌های رشد یافته در محیط MRS براث تلقیح شده و به مدت ۲۴ ساعت در جار بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت. بخشی از سوپرناتانت فاقد سلول با pH اولیه که به دلیل فعالیت میکروارگانیسم‌ها و تولید اسیدهای ارگانیک تشکیل شده، استفاده شد (aCFS) و pH قسمت دیگرسوپرناتانت با استفاده از سدیم هیدروکسید روی ۵/۵ تنظیم (nCFS) و برای سنجش فعالیت ضدمیکروبی استفاده گردید. جهت اطمینان از نبود سلول در هر دو سوپرناتانت، با استفاده از فیلتر سر سرنگی و دستگاه خشک‌کن انجمادی (BETA LCS plus 2-8) لیوفیلیزه شدند (انجماد در ۴۵- درجه سانتی‌گراد و حرارت‌دهی تحت خلأ ۰/۳۸ میلی‌بار در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ساعت). پودرهای لیوفیلیزه شده از هر دو نوع سوپرناتانت با استفاده از ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل شده و پتانسیل ضدمیکروبی آن‌ها با روش انتشار در آگار مورد بررسی قرار گرفت. در آزمون مورد بررسی از ۳ سویه بیماری‌زا گرم مثبت *Staphylococcus aureus* ATCC 25923، *Listeria monosytogenes* ATCC 19115، *Bacillus cereus* ATCC 14579 و ۳ سویه بیماری‌زا گرم منفی نظیر *Shigella dysenteriae* PTCC 1188، *Salmonella typhimurium* PTCC 1609 و *Escherichia coli* ATCC 25922 بودند. غلظتی معادل نیم مک فارلند از سویه‌های پاتوژن تهیه و بر محیط MHA (مرک، آلمان) کشت داده شد. سپس با استفاده از انتهای پیپت استریل به قطر ۶ میلی‌لیتر روی محیط ایجاد و ۱۱۰ میکرولیتر از سوپرناتانت خنثی و اسیدی باکتری، در چاهک‌ها ریخته شد. به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید و با استفاده از خط‌کش قطر هاله عدم رشد محاسبه شد (۹).

جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی به روش دیسک، سویه‌های پاتوژن در محیط کشت MHB و سویه *L. lactis* M69 در محیط MRS براث به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس استاندارد نیم مک فارلند از سویه لاکتیکی و پاتوژن تهیه گردید. به مدت ۱۵ دقیقه دیسک‌های کاغذی (پادتن طب، ایران) در عصاره باکتری قرار داده شدند و در مرحله بعد روی پلیت‌های MRS آگار حاوی سویه‌های بیماری‌زا قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد توسط خط‌کش اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ صورت پذیرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و سطح

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-10]

[DOI: 10.61186/nsft.19.4.35]

اطمینان ۹۵ درصد و برای رسم نمودارها از Excel 2016 استفاده گردید.

• یافته‌ها

آزمون مقاومت به اسید و نمک‌های صفراوی

درصد زنده‌مانی *L. lactis* M69 در درصدهای متفاوت pH در جدول ۱، آورده شده است. در pHهای بسیار اسیدی (pH=3) میزان زنده‌مانی کمتر و برابر با ۶۹ درصد بود و با افزایش pH درصد زنده‌مانی و سویه موردنظر افزایش یافت به طوری که در pH=5، ۹۹ درصد زنده‌مانی سویه مشاهده گردید.

جدول ۱. درصد زنده‌مانی *L. lactis* M69

L. lactis M69	pH=3	pH=4	pH=5
درصد زنده‌مانی	۶۹ درصد	۹۱ درصد	۹۹ درصد

مقاومت سویه *L. lactis* M69 نسبت به غلظت‌های متفاوت نمک‌های صفراوی (۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ درصد وزنی/حجمی) بررسی و نتایج در جدول ۲، گزارش گردید. طبق نتایج به دست آمده، سویه دارای توانایی رشد در غلظت‌های مختلف نمک صفراوی بود.

جدول ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی بر میزان رشد سویه *L. lactis* M69

باکتری/درصد نمک‌های صفراوی	کنترل	۰/۳	۰/۵	۰/۷
L. lactis M69	رشد	رشد	رشد	رشد

هیدروفوبیستی سطح سلول

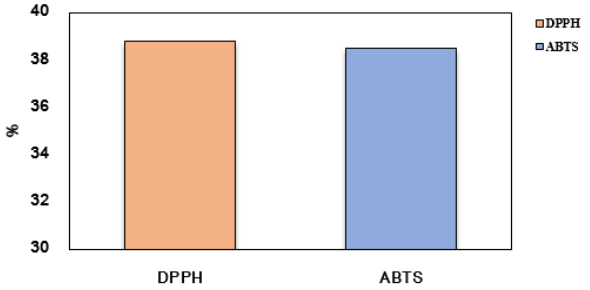
هیدروفوبیستی بر اساس میل میکروارگانیسم‌ها به حلال‌های آلی و غیرقطبی می‌باشد که توسط اجزای آبگریز موجود در غشای خارجی باکتری‌ها ایجاد می‌گردد. در این راستا از ان-هگزادکان، اتیل استات و کلروفرم جهت بررسی آبگریزی سطح سلول استفاده شده که طبق مخلوط کردن سوسپانسیون میکروبی و محلول غیرقطبی و سنجش OD_{600} سطح آبی، قبل و بعد از اضافه شدن محلول محاسبه می‌شود. کاهش جذب سوسپانسیون بعد از قرارگیری در معرض هیدروکربن‌ها، هیدروفوبیستی باکتری را تعیین می‌نماید (۹). میزان آبگریزی *L. lactis* M69 معادل ۰/۴۷± ۵۶/۳۵ به دست آمد.

DNase، فعالیت همولیتیکی و تولید آمین بیوژنیک

بر اساس مشاهدات، نتیجه آزمون تولید DNase توسط *L. lactis* M69 منفی بوده و هیچ‌گونه ناحیه مشخصی در اطراف کلنی‌ها بر محیط کشت رؤیت نگردید. نتیجه منفی آزمون فعالیت همولیتیکی نشان‌دهنده عدم تجزیه خون و عدم بیماری‌زایی به‌وسیله سویه مذکور می‌باشد. آمین‌های بیوژنیک در بروز مسمویت غذایی حائز اهمیت هستند؛ در سویه *L. lactis* M69 تولید آمین بیوژنیک مشاهده نشد. بنابراین، طبق نتایج به دست آمده این سویه ایمن بوده و می‌تواند سلامت عمومی را افزایش دهد.

ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی DPPH و ABTS

شکل ۱، نشان‌دهنده نتایج حاصل از میزان مهار رادیکال آزاد توسط *L. lactis* M69 است.



شکل ۱. فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH و ABTS) *L. lactis* M69.

جذب کلسترول

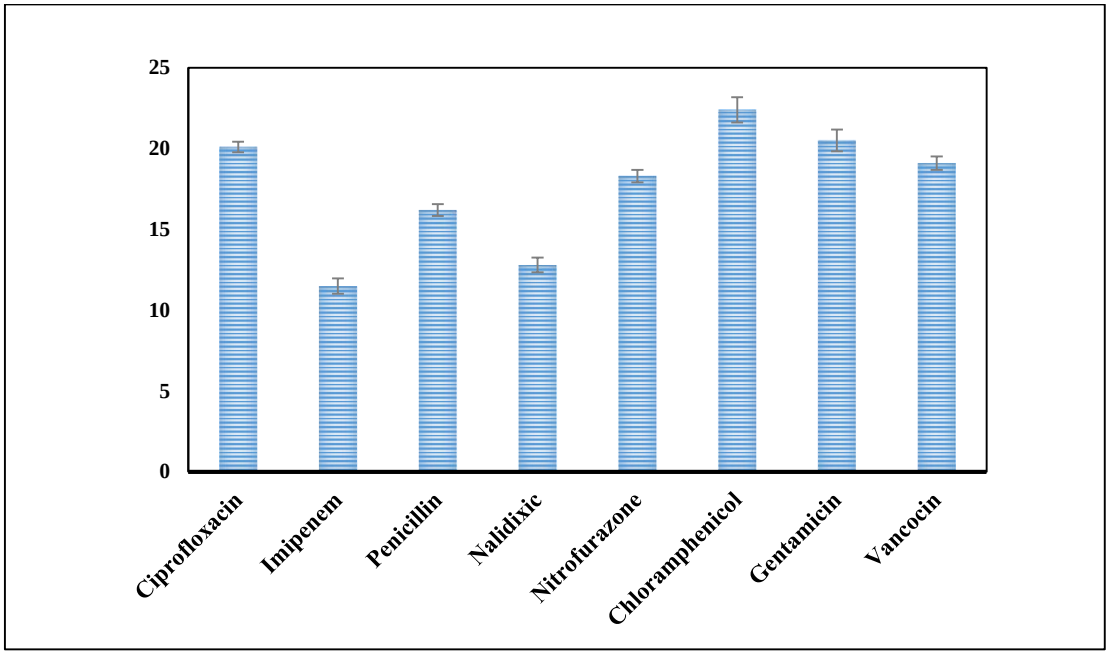
افزایش دریافت و تجمع بیش از حد کلسترول در بدن منجر به بروز بیماری‌هایی نظیر سرطان، چاقی، دیابت و انواع بیماری‌های قلبی-عروقی می‌شود که نتیجه آن، افزایش نرخ مرگ و میر است. درمان‌های دارویی رایج‌ترین روش جهت درمان و کاهش کلسترول در بدن هستند با این حال، مصرف بیش از حد دارو سبب ایجاد بیماری‌های گوارشی می‌شود و سلامت انسان را به خطر می‌اندازد. امروزه استفاده از محصولات حاوی باکتری‌های پروبیوتیک به دلیل بهبود عملکرد و حفظ تعادل روده و نیز افزایش سیستم ایمنی بدن توصیه می‌گردد. در پژوهش حاضر *L. lactis* M69 کلسترول را به میزان ۰/۵۶± ۴۰/۴۰ درصد کاهش داد.

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و فعالیت ضدمیکروبی

جدول ۳، بیانگر میزان مقاومت سویه *L. lactis* M69 نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی می‌باشد. نتایج نشان داد *L. lactis* M69 نسبت به آنتی‌بیوتیک Chloramphenicol بیشترین حساسیت را داشته که برابر با ۰/۷۸± ۲۲/۴۰ میلی‌متر بود و بیشترین مقاومت نسبت به Imipenem با قطر ۰/۴۸± ۱۱/۵۰ میلی‌متر مشاهده شد.

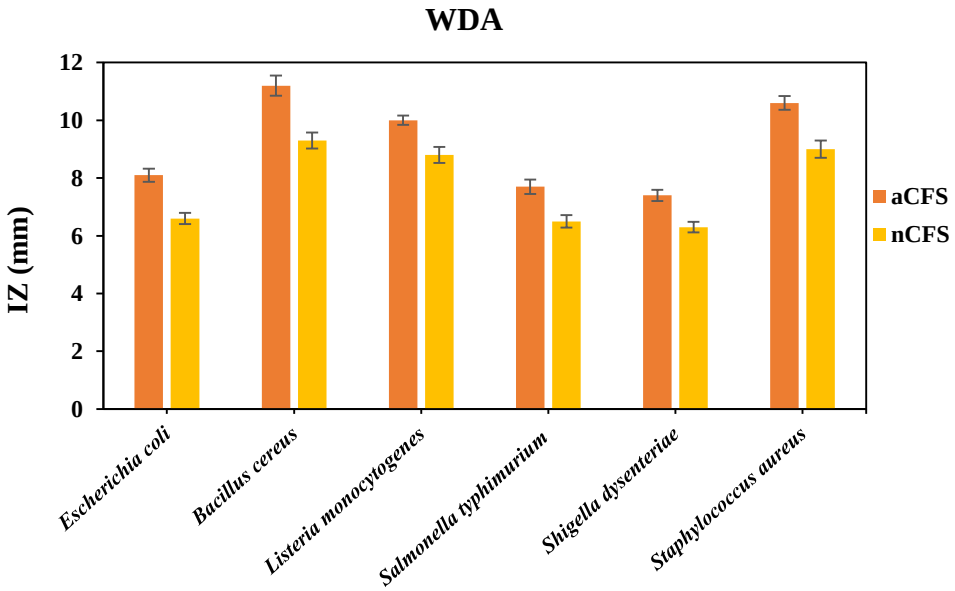
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-10]

[DOI: 10.61186/nsft.19.4.35]



شکل ۲. اثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی بر رشد *L. lactis* M69

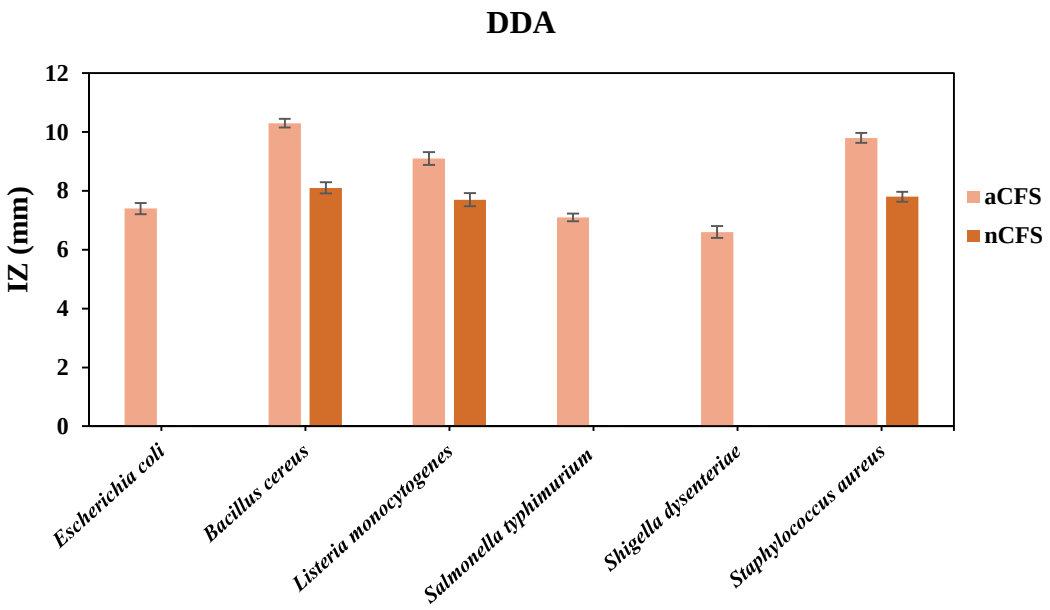
اثر ضدمیکروبی *L. lactis* M69 روی بعضی باکتری‌های پاتوژن شاخص در شکل ۳ و ۴ به ترتیب با روش‌های چاهک آگار و دیسک دیفیوژن آگار نشان داده شده است. نتایج حاصل از روش چاهک آگار حاکی از آن بود که *L. lactis* M69 روی تمامی سویه‌های بیماری‌زا دارای اثر ضدمیکروبی بود، به طوری که بیشترین ممانعت‌کنندگی از رشد سوپرناتانت خنثی شده فاقد سلول (nCFS) و سوپرناتانت اسیدی فاقد سلول (aCFS) بر *B. cereus* با قطر هاله عدم رشد ۹/۳۰ ±۰/۲۸ و ±۰/۳۵ ۱۱/۲۰ مشاهده گردید. کمترین اثر ضدمیکروبی nCFS و aCFS روی *S. dysenteriae* بود. در روش دیسک دیفیوژن، nCFS بر *E. coli*، *S. dysenteriae* و *S. typhimurium* بی‌تأثیر بوده و بیشترین اثر روی *B. cereus* با قطر هاله ۸/۱۰ ±۰/۱۹ مشاهده شد. علاوه بر این، aCFS در روش دیسک دیفیوژن، به ترتیب کمترین و بیشترین اثر را بر *S. dysenteriae* با قطر هاله ۶/۶۰ ±۰/۲۰ و *B. cereus* با قطر ۱۰/۳۰ ±۰/۱۵ داشت.



شکل ۳. فعالیت ضدمیکروبی *L. lactis* M69 بر اساس روش چاهک آگار؛ سوپرناتانت‌های بدون سلول CFS (aCFS و nCFS).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-10]

[DOI: 10.61186/nsft.19.4.35]



شکل ۴. فعالیت ضدمیکروبی *L. lactis* M69 بر اساس روش دیسک دیفیوژن آگار؛ سوپرناتانت‌های بدون سلول CFS (aCFS و nCFS).

• بحث

باکتری‌های اسید لاکتیک یکی از مهم‌ترین گروه‌های ارتقادهنده سلامت میکروبیوتای روده انسان هستند و نقش محافظتی آن‌ها مرتبط با تولید ترکیبات ضدمیکروبی، متعادل نمودن فلور میکروبی روده و حذف گونه‌های بیماری‌زا است (۱۴). پروبیوتیک‌ها باید توانایی زنده ماندن در دستگاه گوارش را داشته باشند و از این رو، اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان دارند. با این حال، با قرارگیری در معرض شرایط معده و روده، اثرات سلامت‌بخش پروبیوتیک‌های مصرف شده کاهش می‌یابد. بنابراین کلونیزاسیون در روده توسط پروبیوتیک‌ها، نقش مهمی در بروز خواص آن‌ها دارد. همچنین توانایی چسبیدن به اپیتلیوم یک پیش‌نیاز برای کلونیزاسیون باکتری در دستگاه گوارش و یکی از معیارهای انتخاب پروبیوتیک مناسب می‌باشد (۱۵).

از طرفی جزء اصلی صفرا، نمک‌های صفراوی، برای سلول‌های زنده سمی هستند زیرا توانایی تغییر ساختار غشای سلولی را دارند، در نتیجه برای رسیدن سویه‌های پروبیوتیک زنده به روده کوچک یا بزرگ باید در معرض صفرا قرار بگیرند. همچنین ظرفیت زنده ماندن در روده و تولید اسید لاکتیک، به حفظ محیط اسیدی در روده کمک کرده و از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌نماید. *L. lactis*، اتصالات محکم میان سلول‌های اپیتلیال روده را تقویت کرده و منجر به افزایش یکپارچگی سد روده می‌گردد؛ این ویژگی نفوذپذیری روده را کاهش داده و از ورود ترکیبات مضر به جریان خون جلوگیری می‌کند (۱۶). Chiara و همکاران (۲۰۲۴) بیان کردند که سویه *L. lactis* هنگام قرارگیری در شرایط شبیه‌سازی دستگاه گوارش نرخ بقای بالایی داشت، به طوری که بیش از ۹۰٪ سلول‌ها در pH= ۳ زنده ماندند. علاوه بر آن، سویه‌های *L. lactis* D3 و *L. lactis* A5 بیشترین حساسیت نسبت به غلظت ۰/۳٪ نمک‌های صفراوی را نشان داده و میزان زنده‌مانی به ترتیب معادل ۶۷ و ۵۲ درصد گزارش شد. در مقابل، سویه‌های I1، I7 و A3 به ترتیب ۱۰۰، ۹۹ و ۱۰۰ درصد مقاومت به نمک صفراوی نشان دادند که مطابق با نتایج به دست آمده از این پژوهش بود. میزان زنده‌مانی در غلظت‌های متفاوت با توانایی تحمل سویه‌های جدا شده از منابع مختلف مرتبط دانستند (۱۴). نتایج حاصل از مطالعه سایر پژوهشگران نیز با این پژوهش هم‌خوانی داشت. در این راستا، Lee و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از کیمچی نرخ بقای بالایی در دستگاه گوارش شبیه‌سازی شده داشتند (۱۵). Salanski و همکاران (۲۰۲۲) به بررسی سویه‌های *L. lactis* IBB417 و *L. lactis* IBB109 پرداختند و نتیجه گرفتند سویه‌های مذکور توانایی زنده‌مانی در حضور ۰/۳٪ نمک صفراوی و قرارگیری در pHهای پایین را داشتند (۱۷). توانایی زنده‌مانی در pHهای ۲، ۳ و ۴ توسط Cunha و همکاران (۲۰۲۱) بررسی گردید. نتایج نشان داد که سویه *L. lactis* R7 پس از گذشت زمان موردنظر، توانایی زنده‌مانی و تحمل pHهای ذکر شده را داشت. به علاوه، این سویه نسبت به حضور نمک‌های صفراوی مقاومت نشان داده و زنده ماندن سلول را حفظ نمود (۱۸). پتانسیل پروبیوتیکی سویه‌های *L.*

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-10]
[DOI: 10.61186/nsft.19.4.35]

lactis موجود در شیر طبیعی (خام) و تخمیر شده توسط Kondrotiene و همکاران (۲۰۲۰) بررسی شد. بنابر نتایج به دست آمده دو سویه *L. lactis* LL6 و *L. lactis* LL76 پتانسیل پروبیوتیکی خوبی داشته و در شرایط آزمایشگاهی مقاومت بالایی نسبت به نمک‌های صفراوی و اسیدی نشان دادند و جدایه‌ها در غلظت ۰/۳ و ۰/۵٪ نمک صفراوی بیش از ۹۰٪ مقاوم بودند (۱۹). Silva و همکاران (۲۰۱۹) نیز بیان کردند *L. lactis* DF04Mi و *L. Plantarum* DF60Mi جدا شده از شیر بز، به دلیل مقاومت مناسب در برابر شرایط شبیه‌سازی شده سیستم گوارشی، قابلیت افزوده شدن به غذاها را دارند (۲۰). Kazancigil و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند *L. lactis* NTH4، *L. lactis* NTH6، *L. lactis* NTH8، *L. lactis* NHT9 و *L. lactis* NTH10 سویه‌های بسیار مقاوم در برابر اسید بوده‌اند و به‌طور معنی‌داری در شرایط بسیار اسیدی توانایی حفظ و زنده‌مانی داشتند (۲۱). Ramalho و همکاران (۲۰۱۹) پتانسیل پروبیوتیکی و آنتی‌اکسیدانی *L. lactis* subsp. *cremoris* LL95 بررسی نمودند (۲۲). نتایج حاصل از بقا در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش و مقاومت در برابر غلظت‌های مختلف نمک، pH و نمک‌های صفراوی نشان داد. رشد *L. lactis* subsp. *lactic* در pH اسیدی (۳ =pH) پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون ۷۰٪ کاهش یافته بود، در حالی که رشد طبیعی در شرایط خنثی (۷ =pH) مشاهده گردید و هیچگونه رشدی در شرایط قلیایی (۹ =pH) رؤیت نشد. همچنین سویه در غلظت ۰/۳٪ نمک صفراوی پایدار بود و با افزایش غلظت نمک صفراوی، کاهش تعداد باکتری‌های اولیه در محیط کشت مشاهده شد (۲۳).

هیدروفوبیستی یا آبگریزی سطح سلول بر اساس میزان میل ترکیبی میکروارگانیسم‌ها به حلال‌های آلی و غیرقطبی تعیین می‌شود. در واقع، پتانسیل آبگریزی خاص ارگانیسم و سویه است و می‌تواند تحت تأثیر فاز رشد سلولی، ترکیبات سطح سویه و ترکیبات محیط کشت قرار گیرد. از طرفی، آبگریزی بالا یک ویژگی مثبت از نظر خواص پروبیوتیکی است و به عنوان ظرفیت چسبندگی باکتری‌های پروبیوتیک به سلول‌های اپیتلیال در نظر گرفته می‌شود (۱۴). هیدروفوبیستی یکی از فاکتورهای ضروری برای چسبندگی باکتری به سطوح مختلف و متأثر نمودن بافت میزبان است و عواملی نظیر نیروی گرانش، نیروی واندروالس، حرکت براونی و بار الکتریکی سطح بر آن اثرگذار هستند. وجود بعضی ترکیبات در سطح سلول همچون اسیدهای چرب، پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها از دلایل ایجاد این ویژگی است که از طریق آن اتصال میکروارگانیسم به سلول‌های روده را ممکن می‌سازند (۲۴، ۹). سویه‌های مورد بررسی در پژوهش Chiara و همکاران (۲۰۲۴) میزان هیدروفوبیستی بالایی از خود نشان دادند که معادل ۲۵/۵-۷۸/۸٪ گزارش گردید (۱۴). در پژوهشی بیان شد *L. lactis* LL6 و *L. lactis* LL76 هیدروفوبیستی بالایی داشتند که برابر با ۵۵-۷۰٪ گزارش شده بود (۱۶). ایزوله *L. lactis* R7 جدا شده از پنیر ریکوتا هیدروفوبیستی برابر ۱۱/۱۰ درصد نشان داد و بیان شد این ویژگی پیش‌نیازی برای چسبندگی به اپیتلیوم روده است به طوری که اثر مفیدی بر میزبان گذاشته و می‌تواند با باکتری‌های پاتوژن برای مکان پیوند و اثرگذاری رقابت کند یا آن‌ها را حذف نماید (۱۸). میزان آبگریزی سطح سلول سویه‌های *L. lactis* subsp. *lactic* که از شیر تخمیر شده استخراج شده بودند معادل ۶۱٪ نشان داده شد (۱۴).

با توجه به عدم رؤیت ناحیه مشخص اطراف کلنی‌ها روی محیط کشت نتیجه آزمون تولید DNase توسط *L. lactis* M69 منفی گزارش شد. عدم تجزیه خون توسط سویه نشان‌دهنده عدم بیماری‌زایی آن است که طبق نتایج به دست آمده *L. lactis* M69 فعالیت همولیتیک نداشت، همچنین در پژوهش انجام شده تولید آمین بیوژنیک نیز مشاهده نگردید. آمین‌های بیوژنیک ترکیبات اساساً نیتروژنی هستند که عمدتاً با دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه یا با آمیناسیون و انتقال آلدهید و کتون‌ها تشکیل می‌شوند. این ترکیبات مولکول‌های آلی با وزن کم هستند که در مواد غذایی و نوشیدنی‌ها طی فعالیت‌های آنزیمی مواد خام تشکیل می‌شوند یا توسط دکربوکسیلاسیون میکروبی اسیدهای آمینه، به دلیل پروتئولیز، محتوای اسیدهای آمینه آزاد افزایش می‌یابد و فعالیت دکربوکسیلاسیونی آنزیم‌های باکتریایی ممکن است به تشکیل آمین بیوژن کمک نماید. غلظت آمین بیوژنیک در غذاهای تخمیر شده تحت تأثیر مواد خام و بهداشت فراوری است. شرایط تخمیر مانند نوع باکتری مورد استفاده، مدت زمان و دمای فرایند و ماتریکس غذا نیز نقش مهمی را ایفا می‌کنند. بنابراین شناسایی و کاهش میزان آمین‌های بیوژنیک در نمونه‌های غذایی به دلیل سمیت آن و استفاده از آن به عنوان شاخص کیفی غذا حائز اهمیت بالایی است. آمین‌های بیوژنیک تولید شده از *S. aureus* مثل کادآورین، هیستامین، تیرامین و پوترسین از عوامل بالقوه مسمومیت برای انسان محسوب می‌شوند. امروزه پروبیوتیک‌ها به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی مواد غذایی و عواملی مهم در پیشگیری از بیماری‌ها، کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی و بهبود وضعیت سلامتی انسان و دام مطرح هستند (۲۵، ۱۶). طبق دستورالعمل FAO/WHO ارزیابی ایمنی میکروارگانیسم پروبیوتیک یک جنبه حیاتی محسوب شده است و عدم وجود فعالیت همولیتیک یکی از

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-10]

[DOI: 10.61186/nsft.19.4.35]

معیارهای لازم برای انتخاب سویه‌های پروبیوتیک است (۱۴). به علاوه، فعالیت همولیتیک باکتری‌ها به توانایی تخریب گلبول‌های قرمز مربوط شده و یکی از خاصیت‌های باکتری‌های بیماری‌زا است (۱۶). نتایج حاصل از پژوهش Chiara و همکاران (۲۰۲۴) نشان داد هیچ یک از سویه‌های آزمایش شده، فعالیت همولیتیک نشان ندادند که نشان‌دهنده ماهیت غیر بیماری‌زای آن‌ها بود (۱۴). Lee و هکاران (۲۰۲۳) گزارش کردند که باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از کیمچی فاقد فعالیت همولیتیکی بودند (۱۵). *L. lactis* R7 از نظر ایمنی نتایج رضایت بخشی نشان داد به گونه‌ای که فاقد فعالیت DNase و همولیتیکی بود بنابراین خطری برای سلامتی انسان ایجاد نخواهد کرد (۱۸). سایر نتایج حاصل از مطالعه پژوهشگران دیگر نیز با تحقیق حاضر مطابقت داشت. همچنین، Kondrotiene و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند تمام سویه‌های *L.* lactis موجود در شیر خام و تخمیر شده فعالیت همولیتیکی نداشتند (۱۹). به علاوه، تمامی سویه‌های مورد بررسی در پژوهش Silva و همکاران (۲۰۱۹) فاقد فعالیت همولیتیک بودند (۲۰). مسیان مقدم و همکاران (۱۴۰۰) نشان دادند که استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک می‌تواند از طریق کاهش جمعیت باکتری‌های مضر و کاهش بیان ژن مولد کادآورین و پوترسین، منجر به کاهش تولید آمین بیوژنیک و افزایش کیفیت شیر گردد (۲۵).

استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل میان عملکردهای آکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در بدن انسان وجود دارد و هنگام افزایش شکل فعال اکسیژن (ROS) از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، اکسیداسیون رخ می‌دهد و باعث آسیب به بافت یا سلول‌ها می‌گردد. از این رو، جهت کاهش استرس اکسیداتیو از آنتی‌اکسیدان‌های خارجی استفاده شده که باعث بهبود توانایی آنتی‌اکسیدانی در بدن انسان می‌شوند. باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های تولیدی آن‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان در حفظ سلامتی انسان و جلوگیری از ابتلا به بیماری‌ها نقش مهمی ایفا می‌نمایند. اگزوپلی‌ساکاریدهای باکتریایی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پپتیدهای زیست‌فعال و یون منگنز برخی از اجزای آنتی‌اکسیدانی موجود در باکتری‌های اسید لاکتیک هستند (۲۷، ۲۶). در این راستا، نتایج حاصل از پژوهش Cunha و همکاران (۲۰۲۱) که به بررسی *L. lactis* R7 پرداختند نشان داد که سویه دارای توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH بود و هنگام تماس با ماده آنتی‌اکسیدانی، تغییر رنگ از بنفش به زرد مشاهده شد (۱۸). همچنین بیان شد که پروبیوتیک‌ها دارای اثرات مفید بسیاری برای سلامتی هستند و مصرف آن‌ها نشان می‌دهد که سویه‌های پروبیوتیکی خاص می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشته باشند و آسیب‌های ناشی از اکسیداسیون را کاهش دهند. *L. lactis* LL95 فعالیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال آزاد ABTS آن برابر با ۴/۶۸ ± ۵۶/۵۰ ٪ بود (۲۲). افزایش میزان کلسترول و تجمع آن در بافت‌های بدن رابطه مستقیمی با ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی، چاقی، سرطان و... دارد که منجر به بالا رفتن نرخ مرگ و میر می‌شود. درمان‌های دارویی رایج طی مدت طولانی، سبب بروز بیماری‌های گوارشی شده که به نوبه‌ی خود بر سلامت انسان تأثیرگذار هستند. یکی از متداول‌ترین روش‌ها جهت کنترل و کاهش خطرات ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، مصرف محصولات دارای باکتری‌های پروبیوتیک است که می‌توانند به عملکرد روده کمک کنند و باعث کاهش کلسترول و افزایش سلامتی شوند (۲۹، ۲۸). Abushelaibi و همکاران (۲۰۱۷) بیان نمودند سویه *L. lactis* KX881768 جدا شده از شیر شتر دارای توانایی بالا جهت حذف کلسترول بود (۳۰). Kondrotiene و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که سویه‌های *L. lactis* در حضور ۰/۵٪ oxgall و کلسترول رشد نکردند (۱۹).

فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های مفید و ارزیابی ایمنی آن‌ها از ویژگی‌های مهم و ضروری باکتری‌ها است. اثر ضدباکتریایی پروبیوتیک‌ها به متابولیت‌هایی همچون اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، فنل‌ها، دی استیل و اتانول ترکیباتی که باعث رشد می‌شوند مرتبط است. باکتریوسین‌ها، اسیدهای آلی و پراکسید هیدروژن از جمله رایج‌ترین ترکیبات ضدمیکروبی گزارش شده هستند که توسط باکتری‌های پروبیوتیک تولید می‌گردند (۱۲). از طرفی، فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک می‌تواند باعث کنترل فرایند تخمیر و افزایش ماندگاری محصولات شود و ترکیباتی از قبیل باکتریوسین‌ها دارای قابلیت استفاده به عنوان افزودنی مواد غذایی هستند. پپتیدها یا پروتئین‌های سنتز شده توسط ریبوزوم، باکتریوسین نامیده می‌شوند؛ باکتریوسین‌ها معمولاً از رشد باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت جلوگیری می‌کنند و ممانعت از رشد انواع باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی به دلیل وجود اسیدهای آلی، اسیدهای چرب هیدروکسی و سایر ترکیبات باعث می‌گردد. همچنین بررسی مقاومت یا حساسیت باکتری‌های اسید لاکتیک نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی جهت آگاهی از ایمنی آن‌ها امری مهم تلقی می‌شود؛ ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک دارای توانایی انتقال به باکتری‌های پاتوژن و مضر موجود در دستگاه گوارش می‌باشند و این انتقال ژن موجب ایجاد مقاوم سویه‌های پاتوژن در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها خواهد شد

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-10]

[DOI: 10.61186/nsft.19.4.35]

و در صورت بروز بیماری، مصرف آنتی‌بیوتیک مؤثر نخواهد بود (۳، ۱). مشخص گردید تمامی سویه‌های *L. lactis* نسبت به Ampicillin، Tetracycline، Gentamicin، Penicillin و Vancomycin با مناطق بازدارندگی در محدوده ۲۵ الی ۳۶ میلی‌متر بسیار حساس بودند و فقط سه سویه در برابر Gentamicin مقاوم بودند. به طور کلی، سویه‌های *L. lactis* به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها حساس هستند و حساسیت بیشتری در آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مشاهده می‌شود که در برابر باکتری‌های گرم مثبت مؤثر هستند (۱۴). سویه *Lactococcus* MG5542 نسبت به Ampicillin، Gentamicin، Tetracycline، Chloramphenicol، Erythromycin، Vanomycin و کلیندامایسین حساس بود (۱۵). حساسیت جدایه‌های *L. lactis* IBB417 و *L. lactis* IBB109 نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر Ampicillin، Vancomycin، Gentamicin، Kanamycin، Streptomycin، Clindamycin، Tetracycline و Chloramphenicol بررسی و بیان شد که هر دو گونه به آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده حساس بودند (۳۱). از آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی نظیر Ampicillin، Chloramphenicol، Clindamycin، Gentamicin و Tetracycline جهت سنجش حساسیت سویه‌های اسید لاکتیک جدا شده از شیر بز نسبت به آنتی‌بیوتیک استفاده گردید. نتایج حاکی از آن بود که سویه‌های *L. lactis* LS2، *L. lactis* LS3 و نسبت به Ampicillin و Tetracycline بسیار حساس و حساسیت کمی در برابر Gentamicin ، Chloramphenicol و Clindamycin داشتند و حساسیت سویه *L. lactis* DF04Mi به Ampicillin بیشتر از سایر آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی بود (۲۰). تمامی جدایه‌های *Lactococcus* از جمله: *L. lactis* NTH4، *L. lactis* NTH6، *L. lactis* NTH8، *L. lactis* NTH9، *L. lactis* NTH10 به آمپی‌سیلین، Chloramphenicol ، Erythromycin، Vancomycin، Kanamycin، Gentamicin و Tetracycline حساس بوده‌اند (۲۱). سویه *L.* lactis subsp. *cremoris* نسبت به Amikacin، Trimethoprim، sulfamethoxazole، Tetracycline، Clindamycin مقاومت نشان داد و نسبت به Ampicillin، Chloramphenicol، Erythromycin، Penicillin، Vancomycin و Ciprofloxacin حساس بود و به Gentamicin حساسیت نسبی نشان داد (۲۲). خماریا و همکاران (۲۰۱۳) حساسیت آنتی‌بیوتیکی را برای مجموعه‌ای از *L. lactis* ها بررسی کردند. گزارش دادند که همه ایزوله‌ها به Ampicillin، Erythromycin، آمینوگلیکوزیدها، Ciprofloxacin و Rifampicin کینولون‌ها حساس هستند. علاوه بر این، ایزوله‌ها به Fosfomycin و Cefepime (گروه بتالاکتام)، Nalidixic acid، Pimidixic acid، Norfloxacin مقاوم بودند (۳۲).

جهت سنجش فعالیت ضدمیکروبی سویه‌های *Lactococcus*، Chiara و همکاران (۲۰۲۴) روش انتشار در چاهک آگار انجام دادند و نتایج حاکی از آن بود که تمامی سویه‌ها به جز I1، قادر به مهار رشد سویه *S. sonnei* بودند و با خنثی شدن سوپرناتانت، اثر باکتری‌کشی به طور کامل از بین رفت (۱۴). سویه *L. lactis* R7 جدا شده از پنیر ریکوتا فعالیت ضدمیکروبی در برابر پاتوژن‌های غذایی نشان داد؛ بیشترین اثر سویه بر *S. aureus* (۱۲/۲ میلی‌متر)، *E. coli* (۱۱/۱ میلی‌متر) و *S. enteritidis* (۹/۵ میلی‌متر) بود (۱۸). Perin و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان دادند *L. lactis* subsp. *lactis* Lc08 فعالیت ضدمیکروبی علیه *L. monosytogenes* در یک سیستم شیر انکوبه شده در ۲۵ درجه سانتی‌گراد داشت و می‌توان از آن به عنوان یک نگهدارنده زیستی در محصولات لبنی استفاده نمود (۳۳). طبق مطالعه Abushelaibi و همکاران (۲۰۱۷) سویه *L. lactis* KX881768 جدا شده از شیر شتر دارای فعالیت ضدمیکروبی بود (۳۰). علاوه بر این، مشخص شد که سویه‌های *L. lactis* LS2 و *L. lactis* DF04MI فعالیت ضدمیکروبی علیه *S. mutans* داشته و قطر هاله‌های ایجاد شده به ترتیب برابر با ۱۰ و ۱۳ میلی‌متر بود (۲۰). *L. lactis* LL95 در مقابل *L. monosytogenes* فعالیت ضدمیکروبی نشان داد و قطر هاله عدم رشد آن برابر با ۱۲ میلی‌متر بود (۲۲). Akbar و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که بیشترین فعالیت ضدمیکروبی *L. Lactic* subsp. *Lactic* علیه *L. monosytogenes* و *S. aureus* بود. (۲۳).

اثر ضدمیکروبی نایسین استخراج شده از *L. lactis* جدا شده از شیر بز روی دو پاتوژن گرم مثبت (*S. aureus* و *B. cereus*) و دو پاتوژن گرم منفی (*P. aeruginosa* و *A. baumannii*) با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار توسط خراسانی و همکاران (۱۴۰۱) بررسی گردید. بررسی قطر هاله عدم رشد نشان داد که پروتئین مستخرج از سویه جدا شده‌ی *L. lactis* حاوی باکتریوسین نایسین است، بر *S. aureus*، *B. cereus* و *A. baumannii* اثر ضدمیکروبی داشت و منطقه ممانعت کننده از رشد ایجاد شده به ترتیب برای باکتری‌های نامبرده برابر با ۱۳، ۱۷ و ۱۴ میلی‌متر بود (۳۴). آنالیز آماری نتایج مطالعه گونه‌های جدا شده از ترخینه نشان داد که جدایه لاکتیکی دارای اثر ضد باکتریایی بود اما تفاوت معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد *S. aureus* و قطر هاله عدم رشد *E. coli* در حضور جدایه مذکور نداشت (۳۵).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-10]

[DOI: 10.61186/nsft.19.4.35]

نتیجه‌گیری

مطابق با یافته‌های مطالعه، *L. lactis* M69 توانست pHها و درصدهای مختلف نمک‌های صفراوی را تحمل کند و نسبت به شرایط دستگاه گوارش سازگاری نشان دهد. به علاوه، فاقد فعالیت همولیتیکی، DNase و تولید آمین بیوژنیک بود و دارای توانایی مهار رادیکال‌های آزاد و جذب کلسترول را داشت. مهار باکتری‌های بیماری‌زا و حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های متداول به عنوان ویژگی‌های مثبت برای یک باکتری معرفی می‌شود؛ از این رو، سویه *L. lactis* M69 جداسازی شده از ماست محلی پتانسیل پروبیوتیکی و ضدمیکروبی خوبی داشته و می‌تواند بعد از انجام تست‌های تأییدی دیگر و آزمایش‌های بیشتر به عنوان مکمل پروبیوتیکی در محصولات غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت مالی طرح پژوهشی به‌شماره ۱۴۰۲/۵۳ که این مقاله مستخرج از آن می‌باشد، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

• References

1. Hojjati M, Alizadeh Behbahani B, Falah F. Investigation of technological and antimicrobial characteristics of *Lactobacillus bervis* gp104 from Khikki cheese. *Applied microbiology in food industries*. 2021; 7(3): 14-26.
2. Jooyandeh H, Alizadeh behbahani B, Noshad M. The effect of inulin on the viability of *Lactobacillus fermentum* strain 4-17 in probiotic ice cream and evaluation of its microbial and physicochemical properties. *FSCT* .2021; 18 (113):91-100
3. Alizadeh Behbahani B., Noshad M, Jooyandeh H. Investigation of technological characteristics of *Lactobacillus casei* CE28.26 and *Lactobacillos acidophilus* strain BCRC10695 and determination of their antimicrobial activity against foodborne pathogenic bacteria. *Applied Microbiology in Food industries.* 2021; 7(1): 1-16.
4. Omidvar F, Eshghi M, Nateghi L. The study of probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from honey and possibility of production probiotic peach juice and strawberry juice. *Journal of applied microbiology in food industry*. 2019; 5(2): 39-55.
5. Davar panah E, & Taheri T. Lactococcus lactis: an expression system suitable for the production of hetrologius proteins. Iranian Journal of Biology. 2022; 6(11):92-102.
6. Farahbakhsh M, Hakimi H, Bahram Abadi R, Zolfaghari M, Doraki N. Isolation of Probiotic Lactobacilli from Traditional Yogurts Produced in Rural Areas of Rafsanjan and their Antimicrobial Effects, 20012. *Journal of Rafsanjan university of medical*.2013; 12 (9) :733-746
7. Saboktakin‐Rizi1, Mahboobe, Alizadeh Behbahani, Behrooz, Hojjati, Mohammad, Noshad, Mohammad.2021. Identifcation of *Lactobacillus plantarum* TW29‐1 isolated from Iranian fermented cereal‐dairy product (Yellow Zabol Kashk): probiotic characteristics, antimicrobial activity and safety evaluation. *Journal of Food Measurement and Characterization* (2021) 15:2615–2624.
8. Momenzadeh, Sara, Joyandeh, Hossein, Alizadeh Behbahani, Behrouz, Barzegar, Hassan. Evaluation of probiotic and antibacterial properties of *Lactobacillus fermentum* SL163. *Iranian Food Science and Technology Research*. 2021. Journal.Vol. 17, No. 2, p. 233- 242.
9. Noshad, Mohammad, Alizadeh Behbahani, Behrooz, Hojjati, Mohammad.2021. Investigation of probiotic and technological characteristics of lactic acid bacteria isolated from native Doogh of Behbahan. *Journal of Food Industry Research*. Volume 31, Number 4.2021.
10. Vasiee, Alireza, Falah, Fereshteh, Alizadeh Behbahani, Behrooz, Tabatabaee-yazdi, Farideh. 2020. Probiotic characterization of *Pediococcus* strains isolated from Iranian cereal-dairy fermented product: Interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line Caco-2. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Volume 130, Issue 5, November 2020, Pages 471-479.
11. Alizadeh Behbahani, Behrooz, Jooyandeh, Hossein, Hojjati, Mohammad, Ghodsi Sheikhjan, Mitra.2023. Evaluation of probiotic, safety, and anti-pathogenic properties of *Levilactobacillus brevis* HL6, and its potential application as bio-preservatives in peach juice. *Food Science and Technology*. 191 (2024) 11560.
12. Barzegar, Hassan, Alizadeh Behbahani, Behrooz, Falah, Fereshteh.2021. Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of Lactobacillus strains isolated from Iranian raw milk cheeses. *Food Science & Nutrition published*. 2021; 9:4094–4107.
13. Kim, Seonyoung, Ji Yeon Lee, Yulah Jeong, and Chang-Ho Kang. 2022. "Antioxidant Activity and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria" *Fermentation 8*, no. 1: 29. https://doi.org/10.3390/fermentation8010029.
14. Chiara I.D, Marasco R, Della Gala M, Fusco A, Donnarumma G, and Muscariello L. 2024. Probiotic properties of *Lactococcus lactis* strains isolated from natural whey starter cultures. *Foods*. 13(957). https://doi.org/10.3390/foods13060957
15. Lee J, Kim S, and Kang Ch.H. 2023. Screening and probiotic of Lactic acid bacteria with potential immunostimulatory activity isolated from Kimchi. *Fermentation*. https://doi.org/10.3390/fermentation9010004
16. Kondrotiene K, Zavistanaviciute P, Aksomaitiene J, Novoslavskij A, and Malakauskas M. 2024. *Lactococcus lactis* in dairy fermentation-health promoting and probiotic properties. *Fermentation*. https://doi.org/10.3390/fermentation10010016
17. Salanski p, Kowalczyk M, Bardowski J.K, and Szczepankowska A.K. 2022. Health-promoting nature of *Lactococcus lactis* IBB109 and *Lactococcus lactis* IBB417 strains exhibiting proliferation inhibition and stimulation of interleukin-18 expression in colorectal cancer cells. *Food microbiology*. Doi: 10.3389/smicb.2022.822912
18. Cunha Ch, Uecker J.N, Jaskulski I.B, Rosolen M.D, Bordini F.W, Andreazza R, Hubner S.O, Fiorentini A.M,

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-10]

[DOI: 10.61186/nsft.19.4.35]

Silva W.P, and Pieniz S. 2021. Probiotic characterization and safety assessment of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 isolated from Ricotta cheese. *Research Square*. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1135986/v1

19. Kondrotiene K, Lauciene L, Andruleviciute V, Kasetiene N, Serniene L, Sekmokiene D, and Malakauskas. 2020. Safecty assessment and preliminary in vitro evaluation of probiotic potential pf *Lactococcus lactis* strains naturally in Raw and Fermented milk. *Current Microbiology*. https://doi.org/10.1007/s00284-020-02119-8.

20. Silva L, Lopes Neto J, and Cardarelli H.R. 2019. Safety and probiotic functionality of isolated goat milk lactic acid bacteria. *Annals of Microbiology*. 69: 1497-1505. https://doi.org/10.1007/s13213.019-015533-z.

21. Kazancigil E, Demirci T, Ozturk-Negis H, and Akin N. 2019. Isolation, technological characterization and in vitro probiotic evaluation of *Lactococcus* strains from traditional Turkish skin bag Tulum cheeses. *Annals of Microbiology*. 69: 1275-1287. https://doi.org/10.1007/s13213-019-01512-4.

22. Ramalho J, Soares M, Spiazzi C, Bicca D, Soares V, Pereira J, Silva W, Sehn C, and Cibin F. 2019. In vitro probiotic and antioxidant potential of *Lactococcus lactis* subsp. *cermoris* LL95 and its effect in mice behavior. *Nutrients*. doi:10.3390/nu11040901.

23. Akbar A, Sadiq M.B, Ali I, Anwar M, Muhammad N, Muhammad J, Shafee M, Ullah S, Gul Z, Qasim S, Ahmad Sh, and Anal A.K. 2019. *Lactococcus lactis* subso. *Lactis* isolated from fermented milk products and its antimicrobial potential. *Journal of food*, 17(1): 214-220. https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1575474

24. Falah F, Mortazavi S.A, Tabatabaei Yazdi, F. Evaluation of properties of *Lactobacillus bervis* strain PML1 based on the ability to adhesion ti the epithelial cells of intestine. *Applied Microbiology in Food industries*. 2019; 5(1): 41-53.

25. Masian Moghadam M.A, Anvar S.A.A, Amini K, and Khani M.R. 2021. Investigating the effect of *Lactococcus lactis* and *Bifidobacterium* treatment on expression of gens producing biogenic amines in *Staphylococcus* strains isolated from milk. *Comparative pathobiology*. 18(1): 3445-3454.

26. Kim, Seonyoung, Ji Yeon Lee, Yulah Jeong, and Chang-Ho Kang. 2022. "Antioxidant Activity and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria" *Fermentation 8*, no. 1: 29. https://doi.org/10.3390/fermentation8010029.

27. Shahrampour D, Khomeiri M, Razavi M.A, Kashiri M. Evaluating the effect of diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different on their antagonistic, antioxidant and aggregation activities. *Iranian journal of nutrition sciences and food technology*. 2019: 39-53.

28. Somashekaraiah, R., Mottawea, W., Gunduraj, A., Joshi, U., Hammami, R., & Sreenivasa, M. Y. (2021). Probiotic and antifungal attributes of *Levilactobacillus brevis* MYSN105, isolated from an Indian traditional fermented food pozha. *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 696267.

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

30. Abushelaibi A, Al-Mahadin S, El-Tarabily Kh, P.Shah N, and Ayyash M. 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT- Food science and technology*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.041.

31. Salanski p, Kowalczyk M, Bardowski J.K, and Szczepankowska A.K. 2022. Health-promoting nature of *Lactococcus lactis* IBB109 and *Lactococcus lactis* IBB417 strains exhibiting proliferation inhibition and stimulation of interleukin-18 expression in colorectal cancer cells. *Food microbiology*. Doi: 10.3389/smicb.2022.822912

32. Khemariya P, Singh S, Nath G, Gulati AK. 2013a. Isolation, identification, and antibiotic susceptibility of nis+ *L. lactis* from dairy and non-dairy source. Czech *J Fd Sci*., 31(4): 323-331.

33. Perin L.M, Miranda R.O, Camargo A.C, Colombo M, Carvalho A.F, and Nero L.A. 2013. Antimicrobial activity of the Nisin Z producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Lc08 against Listeria monocytogenes in skim milk. 65(5): 1554-1560.

34. Khorasani Homa, Kazemipour Nadia, Meybodi Seyed Mansour, Khoshroo Seyed Mohammadreza, and Motaghi Mohammadmehdi. 2022. Antimicrobial effect of nisin exteracted from *Lactococcus lactis* isolated from goqt milk on some bacteria causing food spoilage. *Applied Microbiology In Food Industries*. 8(1): 28-41.

35. Sarani A, Sadeghi A, Khomeiri M, Maghsoudlou Y, Moayedi A, and Ebrahimi M. 2018. Molecular identification and evaluation of antimicrobial effects of dominant *LAB* isolated from Tarkhineh and its bacteriocin-like substances on so,e foodborne microorganisms. *Food microorganism*. 6(3): 47-59

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-10]

[DOI: 10.61186/nsft.19.4.35]

Isolation and Identification of *Lactococcus lactis* M69 Strain from Local Yogurt and Assessment of Its Probiotic, Antimicrobial and Safety Characteristics

*Alizadeh Behbahani B[*1], Mehrnia MA[1], Jooyandeh H[2], Matori F[3]*

1-[*]Corresponding author: 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.
E mail: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

2- 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.

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

4-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.

Received 16 May, 2024 **Accepted 2 Jul, 2024**

Background and Objectives: In recent years, fermented products have received much attentions due to their high nutritional values and positive biological effects and lactic acid bacteria are the major and most important group of bacteria in these products. The present study was carried out to assess probiotic, antimicrobial and safety characteristics of *Lactococcus lactis* M69 strain isolated from local yogurts.

Materials & Methods: First, the desired strain was assessed for probiotic characteristics, including acid resistance (pH 3, 4 and 5), bile resistance (0.3, 0.5 and 0.7%), hydrophobic characteristic and cholesterol absorption. Biogenic amine production, DNase inactivity and hemolytic activity were investigated as well. Then, antioxidant capacity of the isolated strain (ABTS and DPPH) was assessed and the antimicrobial characteristic was assessed using disk diffusion and infiltration in agar well against six pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monosytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Bacillus cereus*). Resistance to common therapeutic antibiotics (vancomycin, nitrofurazone, chloramphenicol, ciprofloxacin, penicillin, nalidixic, imipenem and gentamicin) was investigated.

Results: Results of the acid resistance assessment showed that the survival percentage decreased greatly with the decrease in pH. Moreover, 69% survival rate was observed at pH 3 and 99% survival rate at pH 5. The strain grew in all bile salt concentrations. The hydrophobicity was 56.35% ±0.47. The strain did not show hemolytic activity and DNase and biogenic amine productions. Cholesterol absorption rate was 40.40% ±0.56 and DPPH and ABTS free radical inhibition rates were 33.80% ±0.49 and 38.50% ±0.41, respectively. Results of the antimicrobial effect showed that in disc diffusion and well methods, acidic cell-free supernatant (aCFS) and neutralized cell-free supernatant (nCFS) included the most antimicrobial effect on *B. cereus*. Moreover, *L. lactis* M69 showed the highest resistance to chloramphenicol.

Conclusion: Based on the results, *L. lactis* M69 strain includes acceptable probiotic and technological potentials for use in food products.

Keywords: *Lactococcus lactis*, Antioxidant activity, Probiotic, Antimicrobial effect

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-10]

[DOI: 10.61186/nsft.19.4.35]