Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Food Processing and Preservation Journal

Print ISSN: 2423-3544
Online ISSN: 2423-3803

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

Investigation of safety, probiotic properties and ability of aromatic compounds production of proteolytic lactic acid bacteria isolated from raw milk

Zahra Zareie[1], Ali Moayedi[2]*, Morteza Khomeiri[3], Yahya Maghsoudlou[3], Farhad Garavand[4], Kourosh Tabar-Heidar[5]

[1]Ph.D. student, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[2]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, Email: amoayedi@gau.ac.ir
[3]Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[4]Post-doctoral Researcher, Department of Food Chemistry and Technology, Teagasc Food research Institute, Ireland
[5]Associate Professor, Faculty of Clean Technologies, Chemistry and Chemical Engineering Research Center of Iran, Tehran, Iran

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2023-5-19
Revised: 2023-7-21
Accepted: 2023-8-29

Keywords:
Lactic acid bacteria
Proteolytic activity
Probiotic properties
Aromatic compounds

ABSTRACT

Background and objectives: Dairy products are good sources of lactic acid bacteria (LAB). Proteolytic activity as one of the physiological properties of LAB plays important role in generating the aroma and taste of various cheeses, and reducing their ripening time. Therefore, the identification of multifunctional strains can result in introducing novel cultures in order to manufacture the products with desired sensory properties and health-promoting effects. The aim of this study was to evaluate the proteolytic activity and probiotic properties of some LAB and their ability to produce aromatic compounds.

Materials and methods: In this research, the proteolytic activity of 3 strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbruekii*, and *Lactobacillus fermentum* was measured using the well diffusion method in Skim milk agar medium. Also, some immune properties include resistance to antibiotics such as erythromycin, penicillin, clindamycin, gentamicin, vancomycin, tetracycline, ampicillin and chloramphenicol, hemolytic activity and production of biogenic amines and a number of probiotic characteristics including cell surface hydrophobicity, auto-aggregation, co-aggregation and antimicrobial activity of these 3 strains were investigated. In addition, the ability to produce two aromatic compounds, diacetyl and acetylene, was evaluated qualitatively.

Results: The diameter of the halos created as a result of the proteolytic activity of *L. fermentum*, *L. delbrueckii* and *L. lactis* subsp. *lactis* was 29.5, 25 and 15.7 mm, respectively. These strains were resistant to gentamicin and vancomycin and sensitive to chloramphenicol. The studied strains did not show any hemolytic activity and the ability to produce biogenic amines was not observed in them. In *L. fermentum*, *L. delbruekii* and *L. lactis* subsp. *lactis*, the level of cell surface hydrophobicity was 83.33, 62.67 and 8.94%, respectively, and the auto-aggregation rate was 35.68%, 23.61% and 7.16% respectively. All 3 strains had a relatively high co-aggregation percentage with *S. aureus S. typhimurium*, *L. monocytogenes* and *E. coli* and showed a good antimicrobial effect on the studied pathogens. Also, the highest intensity of color resulting from the production of diacetyl and acetoin was observed in *L. fermentum* and *L. delbruekii*, respectively.

Conclusion: In this research, it was found that all three strains are safe and have good probiotic properties. In addition, due to their proteolytic activity, these strains are capable of producing the aromatic compounds of diacetyl and acetoin. Therefore, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. delbruekii* and *L. fermentum* bacteria can be used as starter cultures to produce cheeses with a shorter ripening period and health-promoting potential.

Cite this article: Zareie, Z., Moayedi, A., Khomeiri, M., Maghsoudlou, Y., Garavand, F., Tabar-Heidar, K. 2023. Investigation of safety, probiotic properties and ability of aromatic compounds production of proteolytic lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Food Processing and Preservation Journal*, 15(3), 35-54.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/FPPJ.2023.21342.1760
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

فرآوری و نگهداری مواد غذایی
شاپا چاپی: ۳۵٤٤-۲٤۲۳
شاپا الکترونیکی: ۳۸۰۳-۲٤۲۳

بررسی ایمنی و ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از شیر خام و ارزیابی توانایی آن‌ها در تولید ترکیبات معطر

زهرا زارعی[۱]، علی مویدی[۲*]، مرتضی خمیری[۳]، یحیی مقصودلو[۳]، فرهاد گراوند[٤]، کورش تبار حیدر[٥]

[۱] دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۲] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، رایانامه: amoayedi@gau.ac.ir
[۳] استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[٤] محقق پسا دکتری گروه شیمی و فناوری مواد غذایی، مرکز تحقیقات غذایی Teagasc، ایرلند
[٥] دانشیار پژوهشمده فناوری های پاک، پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۲/۰۲/۲۹
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۲/۰٤/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۲/۰٦/۰۷

واژه‌های کلیدی:
باکتری‌های لاکتیک اسید
فعالیت پروتئولیتیکی
ویژگی‌های پروبیوتیکی
ترکیبات معطر

چکیده

سابقه و هدف: محصولات لبنی منبع خوبی از باکتری‌های لاکتیک اسید می‌باشند. فعالیت پروتئولیتیک یکی از خواص فیزیولوژیکی برخی از باکتری‌های لاکتیک اسید می‌باشد که در ایجاد عطر و طعم انواع پنیرها و کاهش دوره رسانیدن آن‌ها نقش دارد. بنابراین، شناسایی سویه‌های با عملکرد چندگانه، می تواند منجر به معرفی کشت‌های جدید با هدف تولید محصولاتی با ویژگی‌های حسی مطلوب و سلامت بخش شود. از این رو، هدف از این پژوهش بررسی ویژگی‌های پروتئولیتیکی و پروبیوتیکی تعدادی از باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از شیر گاو و شیر بز و ارزیابی توانایی آن‌ها در تولید ترکیبات معطر به صورت کیفی بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش فعالیت پروتئولیتیکی ۳ سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* با استفاده از روش انتشار در چاهک در محیط Skim milk agar اندازه‌گیری شد. همچنین برخی از ویژگی‌های ایمنی شامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، پنی‌سیلین، کلیندامایسین، جنتامایسین، ونکومایسین، تتراسایکلین، آمپی‌سیلین و کلرومفنیکل، فعالیت همولیتیکی و تولید آمین‌های بیوژنیک و شماری از ویژگی‌های پروبیوتیکی از جمله آبگریزی سطحی سلول، خوداتصالی، هم‌تجمعی و فعالیت ضد میکروبی این ۳ سویه مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، توانایی تولید ۲ ترکیب معطر دی استیل و استوئین به صورت کیفی ارزیابی گردید.

یافته‌ها: قطر هاله‌های ایجاد شده در نتیجه فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* به ترتیب ۲۹/۵، ۲۵ و ۱۵/۷ میلی‌متر بود. این سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و ونکامایسین مقاوم و به آنتی‌بیوتیک کلرومفنیکل حساس بودند. سویه‌های مورد مطالعه هیچگونه فعالیت همولیتیکی نشان ندادند و توانایی تولید آمین بیوژنیک در آن‌ها مشاهده نشد. در باکتری‌های *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* میزان آبگریزی

سطحی سلول به‌ترتیب برابر با ۸۳/۳۳، ٦۲/٦۷ و ۸/۹٤ درصد و میزان خوداتصالی به ترتیب برابر با ۳۵/٦۸، ۲۳/٦۱ و ۷/۱٦ درصد بود. هر ۳ سویه درصد هم‌تجمعی نسبتاً بالایی با باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیا کلی* داشتند و اثر ضد میکروبی خوبی را علیه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مورد مطالعه نشان دادند. همچنین، بیشترین شدت رنگ حاصل از تولید دی استیل و استوئین به ترتیب در باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش مشخص گردید که هر سه سویه ایمن بوده و خاصیت پروبیوتیکی خوبی دارند. به علاوه، این سویه‌ها به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی خود قادر به تولید ترکیبات معطر دی استیل و استوئین می‌باشند. از این رو، باکتری‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* می‌توانند به عنوان کشت‌های آغازگر جهت تولید پنیرهایی با دوره رسانیدن کوتاه‌تر مورد استفاده قرار گیرند.

استناد: زارعی، ز.، مویدی، ع.، خمیری، م.، مقصودلو، ی.، گراوند، ف.، تبار حید، ک. (۱٤۰۲). بررسی ایمنی و ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از شیر خام و ارزیابی توانایی آنها در تولید ترکیبات معطر. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۵(۳)، ٥٤-۳۵.

DOI: 10.22069/FPPJ.2023.21342.1760

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

امروزه گرایش به مصرف مواد مغذی و فراسودمند[1]، به ویژه محصولات حاوی گونه‌های پروبیوتیک، به دلیل اثرات مثبت این محصولات بر سلامت مصرف‌کنندگان افزایش یافته است. پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده تعریف می‌شوند که وقتی به مقدار کافی تجویز شوند، برای سلامتی میزبان مفید می‌باشند. از مزایای سلامتی پروبیوتیک‌ها می‌توان به تنظیم اختلالات گوارشی، تقویت عملکرد سیستم ایمنی روده، مهار واکنش‌های آلرژیک، محافظت از سیستم قلبی عروقی، اثرات آنتی اکسیدانی و ضد توموری، و خاصیت هیپوکلسترولمی اشاره کرد [۱]. همچنین، سلول‌های پروبیوتیک قادر به تولید مواد ضدمیکروب مانند باکتریوسین‌ها، هیدروژن پراکسید و اسیدهای آلی (اسیدهای بوتیریک، لاکتیک و استیک) می‌باشند [۲]. شیرخام و محصولات لبنی تخمیر شده به عنوان منبع مهمی از این باکتری‌های پروبیوتیک شناخته می‌شوند. باکتری‌های لاکتیک اسید[2] رایج‌ترین میکروارگانیسم‌هایی هستند که به‌عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند. این باکتری‌ها عضو مطلوبی از میکروبیوتای دستگاه گوارش بوده و به‌طورکلی ایمن (GRAS)[3] شناخته می‌شوند [۳ و ٤]. باکتری‌های لاکتیک اسید تعادل جامعه میکروبی را در روده بهبود می‌بخشند، از ورود و گسترش باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند و در درمان یا پیشگیری بیماری‌های روده نقش دارند [۵]. در مطالعات مختلف ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های لاکتیک اسید جداسازی شده از محصولات تخمیری بررسی شده است. به عنوان مثال ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس*[4] و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[5] جداشده از غذاهای تخمیری تایلند بررسی و امکان استفاده از این سویه‌ها جهت تولید شیر فراسودمند گزارش شده است [٦]. هچنین ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از غذاها و نوشیدنی‌های تخمیری هندی [۷]، محصولات لبنی سنتی ایرانی [۸]، ماست و پنیر [۹] و شیرهای تخمیری [۱۰] بررسی شده است. به دلیل برخی از خواص متابولیکی باکتری‌های لاکتیک اسید، این باکتری‌ها به میزان قابل توجهی به طعم، بافت، ارزش غذایی و ایمنی میکروبی غذاهای تخمیر شده کمک می‌کنند [۱۱].

پروتئولیز یکی از خواص فیزیولوژیکی مهم در باکتری‌های لاکتیک اسید می‌باشد. در نتیجه فعالیت پروتئولیتیکی طی تخمیر شیر، پپتیدهای فعال زیستی با خاصیت ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و ضد توموری تولید می‌شوند که در کاهش فشار خون از طریق مهار آنزیم ACE[6] و افزایش ایمنی بدن نقش دارند. در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که سیستم پروتئولیتیکی باکتری‌های لاکتیک اسید هم در استفاده از پروتئین و پپتید برای رشد و هم در فرآیند رسانیدن شیر در محصولات لبنی نقش مهمی دارد [۱۲-۱٦]. پروتئولیز فرآیند بیوشیمیایی اصلی در ایجاد طعم پنیر است. تجزیه کازئین توسط آنزیم‌های انعقاد کننده شیر و پروتئینازها و پپتیدازهای موجود در باکتری‌های لاکتیک اسید منجر به تولید پپتیدها و اسیدهای آمینه آزاد می‌شود. این اسیدهای آمینه تولیدی به عنوان پیش‌ساز ترکیبات معطر بوده که تجزیه آن‌ها به الکل‌ها، آلدئیدها، اسیدها، استرها و ترکیبات گوگردی برای ایجاد طعم مشخص در انواع خاصی از پنیرها ضروری می‌باشد [۱۷]. اثر استفاده از کشت‌های کمکی با فعالیت پروتئولیتیک بالا در بهبود فرایند

[1] Functional
[2] Lactic acid bacteria
[3] Generally recognized as safe
[4] *Pediococcus pentosaceus*
[5] *Lactobacillus plantarum*
[6] Angiotensin I-Converting Enzyme

رسانیدن و عطر و طعم در مطالعات مختلف گزارش شده است. به عنوان مثال کشت کمکی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[1] در تسریع پروتئولیز در طول دوره رسانیدن پنیر چدار تولیدی و بروز عطر و طعم بیشتر در مقایسه با نمونه کنترل نقش داشته است [۱۸]. گزارش شده است که استفاده از کشت‌های کمکی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* MU12 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* S6-4 به‌دلیل افزایش پروتئولیز منجر به تولید ترکیبات معطر بیشتری در پنیرهای چدار می‌گردد [۱۹]. همچنین مشخص گردید که پنیرهای برزیلی تولیدی با استفاده از کشت کمکی *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*[2] با فعالیت پروتئولیتیکی بالا از نظر عطر و طعم دارای پذیرش بالاتری در مقایسه با نمونه‌های فاقد کشت کمکی بودند [۲۰]. بنابراین شناسایی سویه‌های جدید با فعالیت پروتئولیتیکی بالا و قابلیت تولید ترکیبات معطر به تولید پنیرهایی با دوره رسانیدن کوتاه‌تر و ویژگی‌های ارگانولپتیکی بیشتر کمک می‌کند. از این رو، ، هدف از این پژوهش بررسی ایمنی، فعالیت پروتئولیتیکی وویژگی‌های پروبیوتیکی تعدادی از باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از شیر گاو و شیر بز و توانایی آن‌ها در تولید ترکیبات معطر به صورت کیفی بود.

مواد و روش‌ها

محیط‌های MRS، Skim milk agar و Blood agar از شرکت مرک (آلمان)، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت پادتن طب، خون دیفیبرینه گوسفندی از آزمایشگاه درواش (ایران) و L- تیروزین، L- اورنیتین و L- هسیتیدین از شرکت بیوبیسیک (کانادا) تهیه شدند.

سویه‌های میکروبی *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* (BRM3)[3] جدا شده از شیر گاو، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (ORT2)[4] جدا شده از شیر بز و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (BRT4)[5] جدا شده از شیر گاو، *استافیلوکوکس اورئوس*[6]، *لیستریا مونوسیتوژنز*[7]، *سالمونلا تیفی‌موریوم*[8] و *اشرشیاکلی*[9] ذخیره شده در بانک میکروبی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی فعالیت پروتئولیتیکی: از محیط کشت Skim milk agar جهت تعیین فعالیت پروتئولیتیکی سویه‌ها استفاده شد. پس از ایجاد چاهک‌هایی با قطر ٦ میلی‌متر در پلیت‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از باکتری‌ها به درون چاهک‌ها ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در پایان، قطر هاله‌های ایجاد شده در اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری گردید [۲۱].

مقاومت به آنتی‌بیوتیک: مقاومت به آنتی‌بیوتیک طبق روش کبسی و گوراکان (۲۰۰۳) انجام شد [۲۲]. بدین‌ترتیب که، پلیت‌های حاوی محیط MRS agar، با ٤ میلی‌لیتر MRS نیمه جامد (۰/۸ درصد آگار) حاوی ۲۰۰ میکرولیتر باکتری پوشانده شد. پس از نیم ساعت، دیسک‌ها روی محیط قرار داده شد و پلیت‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. مناطق بازدارنده اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد و هاله‌هایی با قطر کمتر از ۱۵ میلی‌متر به عنوان باکتری‌های مقاوم (R)[10]، هاله‌هایی با قطر ۲۰-۱٦ میلی‌متر به عنوان باکتری‌های

[1] *Lactobacillus plantarum*
[2] *Lactobacillus helveticus*
[3] *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
[4] *Lactobacillus delbruekii*
[5] *Lactobacillus fermentum*
[6] *Staphylococcus aureus*
[7] *Listeria monocytogenes*
[8] *Salmonella typhimurium*
[9] *Escherichia coli*
[10] Resistance

نیمه حساس نیمه حساس (SS)[1] و هاله‌هایی با قطر بیشتر از ۲۱ میلی‌متر به عنوان باکتری‌های حساس و حساس (S)[2] تعیین شدند [۲۳].

اندازه‌گیری فعالیت همولیتیک: جهت تعیین فعالیت همولیتیک، باکتری‌های لاکتیک اسید فعال شده بر روی محیط Blood agar حاوی خون گوسفندی کشت داده شد. پلیت‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در پایان، نواحی روشن (β-همولیز)، سبز رنگ (α-همولیز) یا بدون رنگ (γ-همولیز) اطراف کلنی‌ها پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت [۲٤]. باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* به عنوان کنترل مثبت (β-همولیز) مورد استفاده قرار گرفتند [۲۵ و ۲٦].

تولید آمین‌های بیوژنیک: از روش برزگر و همکاران (۲۰۲۱) با اندکی تغییرات جهت بررسی توانایی باکتری‌های لاکتیک اسید در تولید آمین‌های بیوژنیک استفاده شد [۲۷]. ابتدا هر یک از سویه‌های میکروبی به مدت ۲٤ ساعت در محیط MRS broth حاوی ۰/۵ درصد از هر یک از پیشسازهای اسیدهای آمینه شامل L- تیروزین، L- هیستیدین و L- اورنیتین فعال گردید. سپس، سویه‌ها بر روی محیط MRS agar حاوی پیشسازها و ۰/۰۵ درصد بروموکروزول بنفش کشت داده شدند و به‌مدت ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. حضور رنگ بنفش در اطراف کلنی‌ها به‌عنوان توانایی تولید آمین بیوژنیک در نظر گرفته شد.

آبگریزی سطحی سلول[3]: آبگریزی سطحی سویه‌ها با اندازه‌گیری چسبندگی آنها به هیدروکربن هگزان مطابق روش فن و همکاران (۲۰۲۲) بررسی شد [۲۸]. ابتدا جذب هر یک از سویه‌ها در طول موج ٦۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (A_0). سپس ۳ میلی‌لیتر از هر باکتری‌ها با ۱ میلی لیتر هگزان مخلوط شد. مخلوط به‌مدت ۱ دقیقه هم‌زده شد و به‌مدت ۳ ساعت نگهداری گردید. در نهایت جذب مخلوط در ٦۰۰ نانومتر ثبت گردید (A_{3h}). درصد آبگریزی بر اساس رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{Hydrophobicity (\%)} = [1- (A_{3h}/A_0) \times 100]$$

خوداتصالی[4]: از روش پاراشوار و چندرانس (۲۰۱۹) با اندکی تغییر جهت بررسی تجمع خودبخودی سویه‌های میکروبی استفاده شد. ابتدا سوسپانسیون باکتریایی با بافر فسفات (pH =۷) شستشو داده شد. سپس جذب اولیه (A_0) سویه‌ها (10^8 CFU ml/L) در طول موج ٦۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پس از نگهداری نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت، جذب مایع رویی در همان طول موج (A_{2h}) ثبت گردید. تجمع خودبخودی بر اساس فرمول زیر محاسبه شد [۲۹]:

$$\text{Auto-aggregation \%} = 1 - (A_0 / A_{2h}) \times 100$$

هم‌تجمعی[5]: مقدار یک میلی‌لیتر از باکتری‌های لاکتیک اسید با ۱ میلی لیتر از هر یک از سویه‌های بیماری‌زا مخلوط شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤ ساعت انکوبه شد. جذب هر یک از باکتری‌های لاکتیک اسید (A_X)، باکتری‌های بیماری‌زا (A_Y) و مخلوط آن‌ها ($A_X+ A_Y$) در طول موج ٦۰۰ نانومتر در زمان ۰ و ٤ ساعت اندازه‌گیری شد. درصد هم‌تجمعی طبق فرمول زیر محاسبه و گزارش گردید [۳۰]:

$$\text{Co-aggregation \%} = [(A_x + A_y)/2 - A_{x+y}]/[(A_x+ A_y)/2] \times 100$$

بررسی خاصیت ضد میکروبی: از روش دو لایه[6] جهت بررسی خاصیت ضد میکروبی باکتری‌های لاکتیک اسید استفاده شد. بدین ترتیب که یک لوپ از

[1] Semi-sensitive
[2] Sensitive
[3] Cell surface hydrophobicity
[4] Auto-aggregation
[5] Co-aggregation
[6] Overlay

هر یک از سویه‌های مورد مطالعه بر روی ۲ خط به طول ۳ سانتی‌متر و با فاصله ۲ سانتی‌متر از یکدیگر بر روی محیط MRS agar تلقیح و در شرایط غیرهوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها با ۱۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت نیمه جامد حاوی ۰/۸ درصد آگار و هر یک از باکتری‌های بیماری‌زا (10^5 cfu/ml) پوشانده شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. در پایان مناطق شفاف اطراف خطوط به عنوان ناحیه بازدارندگی مورد بررسی قرار گرفته و اندازه‌گیری شدند [۳۱].

تولید استوئین: محیط کشت Clark and Lubs حاوی باکتری (۱ درصد وزنی/ حجمی)، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس تولید استوئین با افزودن محلول الکلی آلفانفتول (۶ درصد) و سدیم هیدروکسید (۱۶ درصد) با ظاهر شدن رنگ قرمز به صورت کیفی مورد بررسی قرار گرفت [۳۲].

تولید دی استیل: از کشت فعال ۲۴ ساعته هر یک از سویه‌ها (۱ درصد وزنی/ حجمی) به ۱۰ میلی‌لیتر شیر فرادما (UHT)[1] اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از روماند با ۰/۵ میلی‌لیتر محلول الکلی آلفانفتول (۱ درصد وزنی/ حجمی) و پتاسیم هیدروکسید (۱۶ درصد وزنی/ حجمی) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. تولید دی استیل با تشکیل یک حلقه قرمز در لوله‌ها مشخص گردید. نتایج با توجه به شدت رنگ حلقه تشکیل شده به صورت ضعیف، متوسط یا قوی گزارش شد [۳۳].

آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۶) و با استفاده از روش تحلیل واریانس یک طرفه[2] مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین ها استفاده گردید ($p\leq$ ۰/۰۵). تمامی آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام شد.

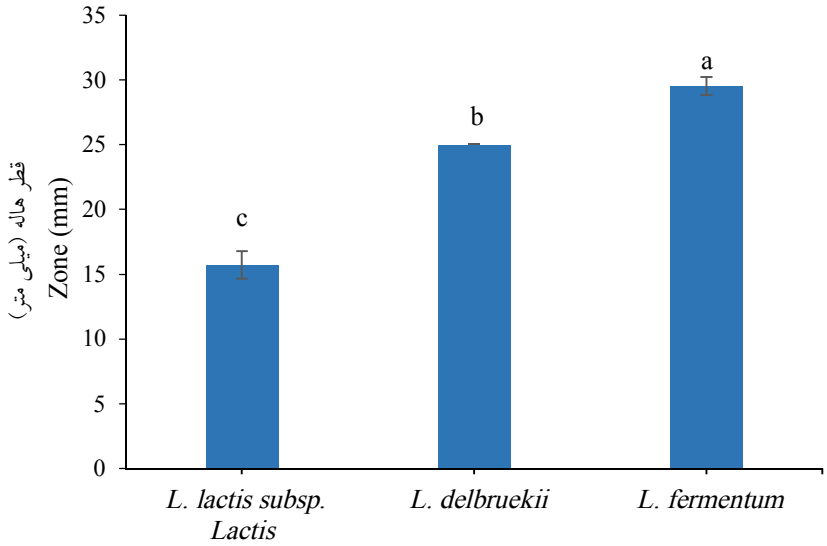
نتایج و بحث

فعالیت پروتئولیتیکی: فعالیت پروتئولیتیک باکتری های لاکتیک اسید لبنی برای رشد باکتری‌ها در شیر ضروری است و در توسعه خواص ارگانولپتیکی محصولات مختلف شیر تخمیری نقش دارد [۳۴]. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، هر سه سویه فعالیت پروتئولیتیکی بالایی در محیط skim milk agar از خود نشان دادند و اختلاف معنی‌داری بین قطر هاله‌های ایجاد شده توسط هر سویه مشاهده شد. باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (BRT4) با قطر هاله ۲۹/۵ mm بیشترین میزان فعالیت پروتئولیتیکی و باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* (BRM3) با قطر هاله ۱۵/۷۵ mm کمترین میزان فعالیت را نشان دادند. در مطالعات گوناگون، فعالیت پروتئولیتیکی خوبی برای باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از نمونه‌های مختلف از جمله شیر و پنیر [۳۵]، انواع شیرهای خام [۲۱]، خمیر ترش [۳۶] و ماهی تخمیری [۳۷] در محیط Skim milk agar گزارش شده است. باکتری‌های لاکتیک اسید پروتئولیتیک، قادر به هیدرولیز سیستم پیچیده پروتئین- لیپیدی می‌باشند. پس از آن، به‌دلیل فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌ها و همچنین اسید لاکتیک تولید شده توسط آنها، پروتئین آزاد شده به پپتیدهای کوچکتر بیشتری هیدرولیز می‌شود. این پروتئین هیدرولیز شده در بروز فعالیت زیستی مانند خواص

[1] Ultra high temperature

[2] One-way ANOVA

آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی نقش دارد [۳۸]. علاوه بر این، فعالیت پروتئولیتیکی این باکتری‌ها در تولید اسید و گسترش عطر و طعم نقش دارد، به گونه‌ای که کشت‌های آغازگر با فعالیت پروتئولیتیک بالا در پنیرهای سخت در حال رسیدن استفاده می‌شوند، درحالی که در پنیرهای تازه رسیده کشت‌های آغازگر با فعالیت پروتئولیتیک پایین ترجیح داده می‌شوند [۳۹].



شکل ۱- فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*.
(حروف کوچک متفاوت بر روی هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌ها در $p \leq 0.05$ است.)

Figure 1. Proteolytic activity *L. lactis* subsp. *Lactis*, *L. delbruekii* and *L. fermentum*.
(Different small letters on each column indicate significant differences between samples at $p \leq 0.05$).

مقاومت به آنتی‌بیوتیک: ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های لاکتیک اسید برای استفاده از آن‌ها به عنوان پروبیوتیک ضروری است، زیرا آن‌ها می‌توانند میزبان ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشند و امکان انتقال آن‌ها را به باکتری‌های بیماری‌زا فراهم کنند [۴۰]. توجه به این نکته ضروری است که در بسیاری از گونه‌های باکتری‌های لاکتیک اسید، ژن‌های مقاومت روی کروموزوم قرار دارند که ذاتی هستند و قابل انتقال نیستند [۴۱]. مقاومت سویه‌های مورد بررسی در این پژوهش در جدول ۱ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (BRT4) به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و ونکامایسین مقاوم، به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، تتراسایکلین و آمپی‌سیلین نیمه‌حساس و به آنتی‌بیوتیک‌های کلیندامایسین و کلرومفنیکل حساس بود. باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (ORT2) به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و ونکامایسین مقاوم، به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و آمپی‌سیلین نیمه‌حساس و به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بود. باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* (BRM3) به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، ونکامایسین و تتراسایکلین مقاوم، به آنتی‌بیوتیک‌های کلیندامایسین و آمپی‌سیلین نیمه‌حساس و به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بود. مقاومت باکتری‌های لاکتیک اسید به آنتی‌بیوتیک‌های گوناگون در مطالعات مختلف گزارش شده است. مقاومت *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و استرپتومایسین [۴۲]، مقاومت برخی از گونه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* به

آنتی‌بیوتیک‌های کلیندامایسین و ونکامایسین [۴۳] و استرپتومایسین و جنتامایسین [۴۴] و مقاومت *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و جنتامایسین گزارش شده است [۴۵].

جدول ۱- مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های باکتری‌های لاکتیک اسید منتخب

Table 1. Antibiotics resistance of selected LAB isolates

باکتری لاکتیک اسید Lactic acid bacteria	آنتی‌بیوتیک Antibiotic							
	اریترومایسین Erythromycin	پنی‌سیلین Penicillin	کلیندامایسین Clindamycin	جنتامایسین Gentamycin	ونکومایسین Vancomycin	تتراسایکلین Tetracycline	آمپی‌سیلین Ampicillin	کلرومفنیکل Chloramphenicol
L. fermentum	I	I	S	R	R	I	I	S
L. delbruekii	S	S	S	R	R	I	I	S
L. lactis subsp. Lactis	S	S	I	R	R	R	I	S

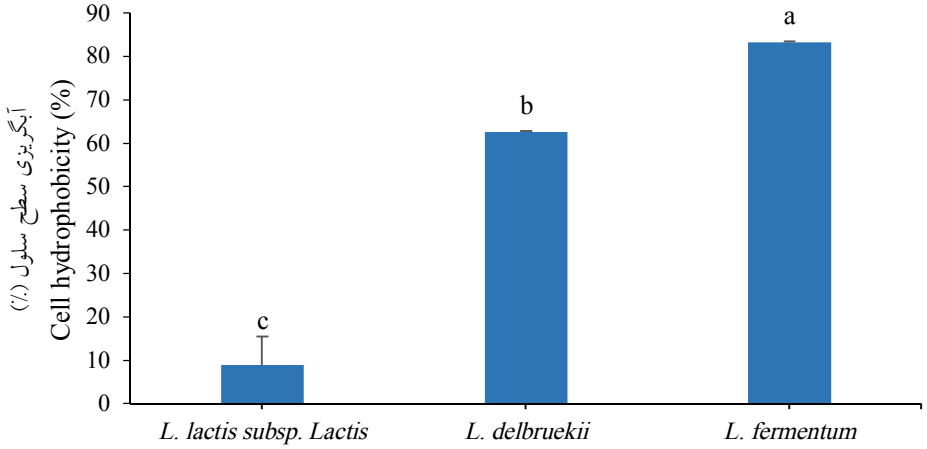
S (Sensitive): حساس، I (Intermediate): نیمه‌حساس، R (Resistant): مقاوم

فعالیت همولیتیک: در این پژوهش، هیچ یک از سویه‌های مورد بررسی، فعالیت همولیتیکی نشان ندادند و از نوع گاما همولیز بودند. عدم وجود فعالیت همولیتیک همواره یک پیش نیاز ایمنی برای انتخاب سویه‌های پروبیوتیک در نظر گرفته می‌شود [۴۶]. به طور مشابه در مطالعات پیشین عدم فعالیت همولیتیکی باکتری‌های لاکتیک اسید از جمله *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* [۴۷]، گونه‌های مختلف *لاکتوکوس لاکتیس* [۴۸]، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* [۴۴] و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* [۴۹] گزارش شده است.

تولید آمین بیوژنیک: این واقعیت که کشت‌های پروبیوتیکی می‌توانند آمین بیوژنیک تولید کنند، برخلاف اثرات غذایی مفیدشان، نیاز به بررسی فعالیت دکربوکسیلاسیون کشت‌های پروبیوتیک قبل از استفاده از آنها در صنعت، را ایجاد می‌نماید [۵۰]. در این پژوهش مشخص گردید که هیچ از سویه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* (BRM3)، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (BRT4) و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (ORT2) قادر به تولید آمین بیوژنیک نبودند. دیپیکا و راشیت (۲۰۱۱)، با تأکید بر این که توانایی تولید آمین بیوژنیک وابسته به سویه است و به گونه مربوط نمی‌شود، گزارش کردند که سویه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* قادر به تولید آمین بیوژنیک نمی‌باشند در حالی که در باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* تولید آمین‌های هیستامین و تیرامین مشاهده شد [۵۱].

آبگریزی سطحی سلول: یکی دیگر از نیازهای اصلی که باید هنگام انتخاب باکتری‌های پروبیوتیک در نظر گرفته شود، آبگریزی سطحی سویه است. آبگریزی سطحی پروبیوتیک‌ها به طور مستقیم توانایی چسبندگی آن‌ها به سلول‌های اپیتلیال روده کوچک را اندازه‌گیری می‌کند، که از ویژگی‌های خاص هر سویه می‌باشد [۵۲ و ۵۳]. نتایج آبگریزی سطحی باکتری‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* (BRM3)، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (BRT4) و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (ORT2) در شکل ۲ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که در آبگریزی

سطحی باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد و کمترین مقدار (۸/۹٤ درصد) و بیشترین مقدار (۸۳/۳۳) به‌ترتیب مربوط به باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* (BRM3) و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (BRT4) می‌باشد. ملیا و همکاران (۲۰۱۸)، آبگریزی سطحی گونه‌های مختلف باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از شیر بوفالو را ۱۹/۰۵ درصد تا ۵۵/٤۹ درصد گزارش کردند [٥٤]. این در حالی است که این ویژگی برای لاکتیک اسید باکتری‌های جدا شده از محصولات لبنی سنتی تا ۸۲/۵ درصد نیز گزارش شده است [٥٥].

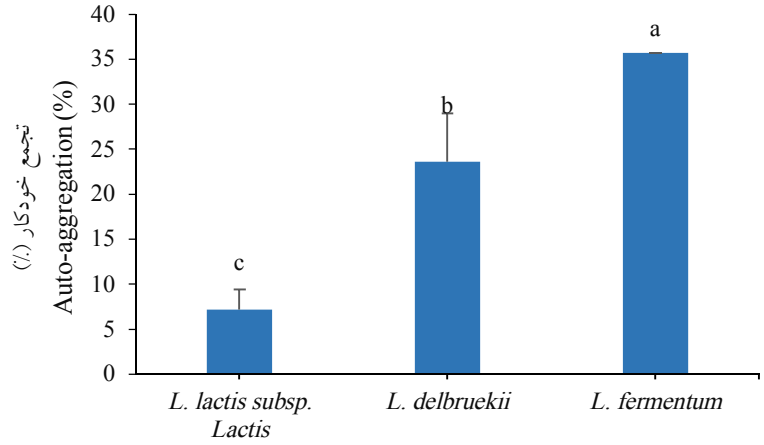


شکل ۲- آبگریزی سطحی باکتری‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*.
(حروف کوچک متفاوت بر روی هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌ها در $p \leq ۰/۰۵$ است.)

Figure 2. Cell surface hydrophobicity value of *L. lactis* subsp. *Lactis*, *L. delbruekii* and *L. fermentum*. (Different small letters on each column indicate significant differences between samples at $p \leq 0.05$).

خوداتصالی: خوداتصالی توانایی باکتری برای تعامل با خود، به روش غیر اختصاصی بوده و برای کلونیزاسیون دستگاه گوارش از طریق چسبندگی ضروری است. باکتری‌های پروبیوتیک برای ایجاد اثرات مفید بر سلامتی خود باید از طریق خوداتصالی به مقدار کافی برسند، بنابراین توانایی تجمع باکتری‌های پروبیوتیک یکی از مطلوب‌ترین خواص محسوب می‌شود [٥٥]. مطابق با شکل ۳، میزان خوداتصالی در باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه لاکتیس (BRM3) ۷/۱٦ درصد، در باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (ORT2) ۲۳/٦۱ درصد و در باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (BRT4) ۳۵/٦۸ درصد به‌دست آمد و این اختلاف معنی‌دار بود. میزان خوداتصالی برای باکتری‌های لاکتیک اسید جداسازی شده از ممحصولات لبنی سنتی تولیدی در چین، ۲۳/۳۳ درصد تا ٤۵/۸۳ درصد گزارش شده است [٥]. مشاهده می‌شود که آبگریزی سطحی سلول با ویژگی خوداتصالی مرتبط است، زیرا سویه‌ای با چسبندگی بالاتر به هیدروکربن هگزان فعالیت خود تجمعی بالاتری را نشان داد، که این نتایج در راستای نتایج سایر محققین می‌باشد [٥ ، ٥٦ و ٥٧]. مالاپا و همکاران (۲۰۱۹)، کمترین میزان خوداتصالی برای سویه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس* را ۷/۱۸ درصد و بیشترین مقدار را ۸۸/۳۹ درصد گزارش کردند [٥۸]. زارعی و همکاران (۲۰۲۳)، میزان خوداتصالی سویه‌های مختلف باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از پنیر سنتی ایرانی را بین ٦ تا ٤۹/٥٦ درصد گزارش کردند [٤۱]. مکانیسم‌های خوداتصالی باکتری‌های

لاکتیک اسید تاکنون به طور دقیق مشخص نشده است. اکثر مطالعات نشان می‌دهند که توانایی خوداتصالی به نوع گونه وابسته بوده و تحت تأثیر شرایط محیطی می‌باشد. این توانایی نتیجه فعل و انفعالات پیچیده فیزیکی و شیمیایی است. در خوداتصالی سلول های بزرگتر و سنگین تر سریعتر رسوب می کنند. با این حال، عوامل اصلی که بر توانایی خوداتصالی تأثیر می گذارد ممکن است بار سطح سلول و اجزای سطح سلول باشد [۵۹].

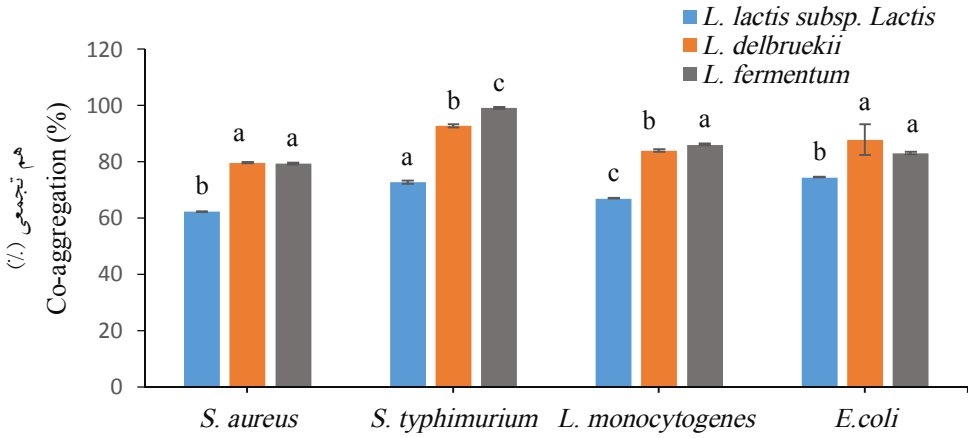


شکل ۳- خوداتصالی باکتری‌های لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس، لاکتوباسیلوس دلبروکی و لاکتوباسیلوس فرمنتوم.
(حروف کوچک متفاوت بر روی هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌ها در $p \leq ۰/۰۵$ است.)

Figure 3. Auto-aggregation of *L. lactis* subsp. *Lactis*, *L. delbruekii* and *L. fermentum*.
(Different small letters on each column indicate significant differences between samples at $p \leq 0.05$).

هم‌تجمعی: درصد هم‌تجمعی هر یک از باکتری‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* (BRM3)، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (ORT2) و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (BRT4) با تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، سالمونلا تیفی‌موریوم، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیاکلی* در شکل ٤ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* میان درصد هم‌تجمعی *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (ORT2) و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (BRT4) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، اما میان درصد هم‌تجمعی این ۲ باکتری با باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* (BRM3) اختلاف معنی‌داری وجود داشت. درصد هم‌تجمعی هر سه سویه برای باکتری‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و *لیستریا مونوسیتوژنز* با یکدیگر اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. همچنین برای باکتری *اشرشیاکلی* میان درصد هم‌تجمعی *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (ORT2) و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (BRT4) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، در حالی که درصد هم‌تجمعی این ۲ باکتری با باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* (BRM3)، اختلاف معنی‌داری را نشان داد. به طور کلی، کمترین درصد هم‌تجمعی بین *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* (BRM3) و *لیستریا مونوسیتوژنز* و بیشترین مقدار بین باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (BRT4) و *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد. در پژوهش‌های مختلف درصد هم‌تجمعی گونه‌های مختلف باکتری‌های لاکتیک اسید بررسی شده است. به عنوان مثال، درصد هم‌تجمعی برای باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* جدا شده از دوغ محلی بهبهان با باکتری *اشرشیاکلی* بیشتر از ۳۰ درصد گزارش شده است [٦۰]. در مطالعه بااو و همکاران (۲۰۱۰) هم‌تجمعی خوبی برای گونه‌های

لاکتوباسیلوس فرمنتوم با برخی از باکتری‌های بیماری‌زا مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشرشیاکلی* گزارش شده است. این پژوهشگران بیان کردند که درصد هم‌تجمعی به‌عواملی از جمله نوع سویه باکتریایی، نوع سویه بیماری‌زا و زمان گرمخانه‌گذاری وابسته می‌باشد [٦١]. هم‌تجمعی سویه‌های باکتریایی نقش مهمی در برخی از بخش‌های اکولوژیکی، به ویژه روده انسان دارد. گزارش شده است که توانایی هم‌تجمعی ممکن است به باکتری‌های لاکتیک اسید اجازه دهد تا با افزایش غلظت مواد ضد میکروبی دفع شده در محیط اطراف، میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را کنترل و از رشد آن‌ها در دستگاه گوارش جلوگیری کنند [٦٢].



شکل ٤- هم‌تجمعی باکتری‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*.
(حروف کوچک متفاوت بر روی هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌ها در $p \leq ٠/٠٥$ است.)

Figure 4. Auto-aggregation of *L. lactis* subsp. *Lactis*, *L. delbruekii* and *L. fermentum*.
(Different small letters on each column indicate significant differences between samples at $p \leq 0.05$).

خاصیت ضد میکروبی: فعالیت ضد باکتریایی یکی از ویژگی‌های مهم سویه‌های پروبیوتیکی می‌باشد. توانایی گونه های باکتری‌های لاکتیک اسید برای تولید عوامل ضد میکروبی در طی فرآیندهای تخمیر می‌تواند ایمنی و کیفیت محصولات غذایی را بهبود بخشد و عمر مفید مواد غذایی را افزایش دهد [٦٣ و ٦٤]. خاصیت ضد میکروبی سویه‌های مورد در این مطالعه (جدول ٢) نشان می‌دهد که تنها در قطر هاله ایجاد شده در باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* (BRM3) و *اشرشیاکلی* اختلاف معنی‌داری با سایر باکتری‌ها مشاهده شد. در حالی که میان قطر هاله عدم رشد در سایر باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. کمترین اثر ضد میکروبی *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* (BRM3) علیه *اشرشیاکلی* و بیشترین اثر *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* (BRM3) بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و سالمونلا تیفی‌موریوم مشاهده شد. در مطالعات مختلف اثر ضد میکروبی انواع باکتری‌های لاکتیک اسید بررسی و گزارش شده است [٤١ و ٦٥-٦٨]. اثر ضد میکروبی باکتری‌های لاکتیک اسید اغلب به دلیل عوامل مختلفی مانند رقابت تغذیه‌ای و تولید ترکیبات گوناگونی مانند اسیدهای آلی، اسیدهای چرب، ترکیبات پروتئینی، اسیدهای فنولیک، پراکسید هیدروژن و ترکیباتی با اثر ضد باکتریایی یا باکتریواستاتیک می‌باشد. علاوه بر این، افت pH ناشی از تولید اسید لاکتیک می‌تواند در مهار گونه‌های خاص بیماری‌زا مؤثر باشد [٦٩ و ٧٠].

جدول ۲- فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های منتخب

Table 2. Antimicrobial activity of selected isolates

باکتری لاکتیک اسید Lactic acid bacteria	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) Inhibition zone (mm)			
	لیستریا مونوسیتوژنز *L. monocytogenes*	*سالمونلا تیفی‌موریوم* *S. typhimurium*	*استافیلوکوکوس اورئوس* *S. aureus*	*اشرشیاکلی* *E.coli*
لاکتوباسیلوس فرمنتوم *L. fermentum*	43.75 ± 1.76 [a]	44.25 ± 2.47 [a]	40.75 ± 2.47 [a]	46.25 ± 1.76 [a]
لاکتوباسیلوس دلبروکی *L. delbruekii*	44.25 ± 1.06 [a]	45 ± 3.53 [a]	40.75 ± 1.06 [a]	46.25 ± 1.76 [a]
لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس *L. lactis subsp. Lactis*	46.25 ± 1.76 [a]	47.5 ± 10. 6 [a]	47.5 ± 3. 53 [a]	37.5 ± 3. 53 [b]

حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌ها در $p \leq ۰/۰۵$ است.

Different letters indicate significant differences between samples at $p \leq 0.05$.

تولید دی استیل و استوئین: باکتری‌های لاکتیک اسید که تقریباً در تمام غذاهای تخمیر شده وجود دارند، دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های مرتبط با ویژگی‌های عطر و طعم می‌باشند [۷۱]. در نتیجه تخمیر سیترات موجود در شیر توسط این باکتری‌ها ترکیبات ٤ کربنه مختلفی، مانند دی استیل، استوئین و بوتاندیول تولید می‌شود که دارای خواص عطر و طعمی هستند [۷۲]. در این مطالعه ارزیابی تولید دی استیل و استوئین به طور کیفی نشان داد که باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (BRT4) و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (ORT2) به‌ترتیب قادر به تولید بیشترین میزان دی استیل و استوئین می‌باشند (جدول ۳). در مطالعات گوناگون، قدرت متفاوتی برای تولید دی استیل توسط گونه‌های مختلف باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از پنیر تولیدی با شیر گاو [۷۳]، پنیرهای سنتی [۷٤ و ۷۵] و شیر بز [۳۳] گزارش شده است. اختلاف در قدرت تولید این ترکیبات آروماتیک می‌تواند به این دلیل باشد که همه باکتری‌های لاکتیک اسید ظرفیت متابولیزه کردن سیترات را ندارند، از این رو این رفتار بین گونه‌ها و سویه‌های مختلف متفاوت می‌باشد [۷۳]. علاوه بر این، در باکتری‌های لاکتیک اسید دی استیل به طور برگشت ناپذیر توسط استوئین ردوکتاز به استوئین احیا می‌شود و در مرحله بعدی، استوئین به طور برگشت‌پذیر توسط همان آنزیم به بوتاندیول احیا می‌شود. این احتمال وجود دارد که تفاوت در میزان دی استیل و استوئین تولیدی توسط سویه‌های مورد مطالعه در این پژوهش نیز به دلیل متابولیزه شدن این ترکیبات به بوتاندیول باشد که اندازه‌گیری نشده است [۷۰]. با این حال، در این پژوهش مشخص گردید که سویه‌های *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (BRT4)، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (ORT2) و *لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس* (BRM3) با فعالیت پروتئولیتیکی بالا، متوسط و پایین قادر به تولید ترکیبات معطر بالایی هستند. از این رو می‌توانند به عنوان کشت‌های کمکی آغازگر جهت تولید محصولات تخمیری مورد استفاده قرار گیرند.

جدول ۳- تولید ترکیبات معطر توسط جدایه‌های باکتری لاکتیک اسید

Table 3. Production of aromatic compounds by LAB isolates

باکتری لاکتیک اسید Lactic acid bacteria	دی استیل Diacetyl	استوئین Acetoin
لاکتوباسیلوس فرمنتوم *L. fermentum*	+++	+
لاکتوباسیلوس دلبروکی *L. delbruekii*	++	+++
لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس *L. lactis subsp. Lactis*	+	++

شدت تولید: +++ > ++ > +

Production intensity: +++ > ++ > +

نتیجه‌گیری کلی

ارزیابی فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس* نشان داد که این باکتری‌ها فعالیت پروتئولیتیکی بالایی داشتند. این سویه‌ها فاقد فعالیت همولیتیکی بوده و هیچ گونه تشکیل آمین بیوژنیک را نشان ندادند. علاوه بر این، این سویه‌ها دارای فعالیت آبگریزی سطحی سلول، خوداتصالی و هم‌تجمعی بوده و اثر ضد میکروبی خوبی را بر روی تعدادی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا نشان دادند. همچنین مشخص گردید که این باکتری‌ها توانایی تولید دی استیل و استئون به صورت کیفی را دارا می‌باشند. با توجه به ویژگی‌های ایمنی، پروبیوتیکی، پروتئولیتیکی و قدرت تولید ترکیبات معطر توسط این سویه‌ها می‌توان از آن‌ها به عنوان کشت‌های آغازگر در تولید پنیرهایی با زمان رسانیدن کم و ویژگی‌های ارگانولپتیکی مطلوب استفاده کرد.

References

[1] Li, T., Teng, D., Mao, R., Hao, Y., Wang, X., & Wang, J. 2020. A critical review of antibiotic resistance in probiotic bacteria. Food Research International, 136, 109571.

[2] Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., & da Cruz, A. G. 2020. Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, *32*, 103-123.

[3] Ruiz-Moyano, S., dos Santos, M. T. P. G., Galván, A. I., Merchán, A. V., González, E., de Guía Córdoba, M., and Benito, M. J. 2019. Screening of autochthonous lactic acid bacteria strains from artisanal soft cheese: Probiotic characteristics and prebiotic metabolism. LWT, 114, 108388.

[4] Loghman, S., Moayedi, A., Mahmoudi, M., and Khomeiri, M. 2020. Antifungal activity of fermented milks produced by single or co-cultures of proteolytic lactic acid bacteria. Food Processing and Preservation Journal, 11(2), 35-48. (In Persian)

[5] Azat, R., Liu, Y., Li, W., Kayir, A., Lin, D. B., Zhou, W. W., and Zheng, X. D. 2016. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. Journal of Zhejiang University Science B, 17(8), 597-609.

[6] Jitpakdee, J., Kantachote, D., Kanzaki, H., and Nitoda, T. 2021. Selected probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented foods for functional milk production: Lower cholesterol with more beneficial compounds. LWT, 135, 110061.

[7] Angmo, K., Kumari, A., Savitri, and Bhalla, T. C. 2016. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. LWT - Food Science and Technology, 66, 428-435.

[8] Amraii, H. N., Abtahi, H., Jafari, P., Mohajerani, H. R., Fakhroleslam, M. R., and Akbari, N. 2014. In vitro study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from traditional dairy products. Jundishapur Journal of Microbiology, 7(6), e10168.

[9] Kanak, E. K., and Yilmaz, S. Ö. 2021. Identification, antibacterial and antifungal effects, antibiotic resistance of some lactic acid bacteria. Food Science and Technology, 41, 174-182.

[10] Thirabunyanon, M., Boonprasom, P., and Niamsup, P. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. Biotechnology Letters, 31(4), 571-576.

[11] Settanni, L., and Moschetti, G. 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. Food Microbiology, 27(6), 691-697.

[12] Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., and Kot, A. M. 2021. Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. Molecules, 26(7), 1858.

[13] Toe, C. J., Foo, H. L., Loh, T. C., Mohamad, R., Abdul Rahim, R., and Idrus, Z. 2019. Extracellular proteolytic activity and amino acid production by lactic acid bacteria isolated from Malaysian foods. International Journal of Molecular Sciences, 20(7), 1777.

[14] García-Cano, I., Rocha-Mendoza, D., Ortega-Anaya, J., Wang, K., Kosmerl, E., and Jiménez-Flores, R. 2019. Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. Applied Microbiology and Biotechnology, 103(13), 5243-5257.

[15] Margalho, L. P., Kamimura, B. A., Brexó, R. P., Alvarenga, V. O., Cebeci, A. S., Janssen, P. W., Dijkstra, A., Starrenburg, M. J., Sheombarsing, R. S., Cruz, A. G., and Alkema, W. 2021. High throughput screening of technological and biopreservation traits of a large set of wild lactic acid bacteria from Brazilian artisanal cheeses. Food Microbiology, 1(100), 103872.

[16] Venegas-Ortega, M. G., Flores-Gallegos, A. C., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R., Martínez-Hernández, J. L., and Nevárez-Moorillón, G. V. 2020. Multi-Functional Potential of Presumptive Lactic Acid Bacteria Isolated from Chihuahua Cheese. Foods, 9(3), 276.

[17] Karagul Yuceer, Y., Tuncel, B., Guneser, O., Engin, B., Isleten, M., Yasar, K., and Mendes, M. 2009. Characterization of aroma-active compounds, sensory properties, and proteolysis in Ezine cheese. Journal of Dairy Science, 92(9), 4146-4157.

[18] Bi, W., Zhao, G., Wang, G., Zhang, B., Lu, S., Liu, H., Li, J., and Chen, L. 2017. Influence on Cheddar cheese proteolysis and sensory characteristics of non-starter strain Lactobacillus plantarum. In International Conference on Material Science, Energy and Environmental Engineering, 62-65

[19] Duan, C., Li, S., Zhao, Z., Wang, C., Zhao, Y., Yang, G., Niu, C., Gao, L., Liu, X., and Zhao, L. 2019. Proteolytic Activity of *Lactobacillus plantarum* Strains in Cheddar Cheese as Adjunct Cultures. Journal of Food Protection, 82(12), 2108-2118.

[20] Azambuja, N. C. D. 2017. Effect of adjunct culture Lactobacillus helveticus (B02) on the composition, proteolysis, free amino acids release and sensory characteristics of Prato cheese. Food and Nutrition Sciences, 8(5), 512-525.

[21] Moayedi, A., Mahmoudi, M., Khomeiri, M., and Loghman, S. 2019. Isolation, molecular identification and safety assessment of proteolytic lactic acid bacteria obtained from different raw milks. Journal of Food Science and Technology, 16(89), 59-69. (In Persian)

[22] Cebeci, A., and Gürakan, C. 2003. Properties of potential probiotic Lactobacillus plantarum strains. Food Microbiology, 20(5), 511-518.

[23] Albayrak, Ç. B., and Duran, M. 2021. Isolation and characterization of aroma producing lactic acid bacteria from artisanal white cheese for multifunctional properties. LWT, 150, 112053.

[24] Halder, D., Mandal, M., Chatterjee, S. S., Pal, N. K., and Mandal, S. 2017. Indigenous probiotic Lactobacillus isolates presenting antibiotic like activity against human pathogenic bacteria. Biomedicines, 5(2), 31.

[25] Ali-Vehmas, T., Vikerpuur, M., Pyörälä, S., & Atroshi, F. 2001. Characterization of hemolytic activity of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitic milk. Microbiological research, 155(4), 339-344.
[26] Parrisius, J., Bhakdi, S., Roth, M., Tranum-Jensen, J., Goebel, W., & Seeliger, H. P. 1986. Production of listeriolysin by beta-hemolytic strains of Listeria monocytogenes. Infection and immunity, 51(1), 314-319.
[27] Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., and Falah, F. 2021. Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of Lactobacillus strains isolated from Iranian raw milk cheeses. Food Science & Nutrition, 9(8), 4094-4107.
[28] Fan, S., Xue, T., Bai, B., Bo, T., and Zhang, J. 2022. Probiotic Properties Including the Antioxidant and Hypoglycemic Ability of Lactic Acid Bacteria from Fermented Grains of Chinese Baijiu. Foods, 11(21), 3467.
[29] Prabhurajeshwar, C., and Chandrakanth, K. 2019. Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic Lactobacilli strains isolated from commercial yoghurt. Clinical Nutrition Experimental, 23, 97-115.
[30] Sakoui, S., Derdak, R., Addoum, B., Pop, O. L., Vodnar, D. C., Suharoschi, R., Soukri, A., and El Khalfi, B. 2022. The first study of probiotic properties and biological activities of lactic acid bacteria isolated from Bat guano from Er-rachidia, Morocco. LWT, 159, 113224.
[31] Adeniyi, B. A., Adetoye, A., and Ayeni, F. A. 2015. Antibacterial activities of lactic acid bacteria isolated from cow faeces against potential enteric pathogens. African Health Sciences, 15(3), 888-895.
[32] Evelyne, C. A., Ginette, G. D., Lessoy, T. Z., and Sebastien, L. N. 2018. Emphasis on functional properties of cocoa-specific acidifying lactic acid bacteria for cocoa beans fermentation improvement. African Journal of Microbiology Research, 12(19), 456-463.
[33] de Almeida Júnior, W. L. G., Ferrari, Í. d. S., de Souza, J. V., da Silva, C. D. A., da Costa, M. M., and Dias, F. S. 2015. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. Food Control, 53, 96-103.
[34] Fguiri, I., Ziadi, M., Rekaya, K., Samira, A., and Khorchani, T. 2017. Isolation and characterization of lactic acid bacteria strains from raw Camel Milk for Potential Use in the Production of Yogurt. International Journal of Dairy Technology, 69(1), 103-113.
[35] Tulini, F. L., Hymery, N., Haertlé, T., Le Blay, G., and De Martinis, E. C. 2016. Screening for antimicrobial and proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from cow, buffalo and goat milk and cheeses marketed in the southeast region of Brazil. Journal of Dairy Research, 83(1), 115-124.
[36] Khanlari, Z., Moayedi, A., Ebrahimi, P., Khomeiri, M., and Sadeghi, A. 2021. Enhancement of γ-aminobutyric acid (GABA) content in fermented milk by using Enterococcus faecium and Weissella confusa isolated from sourdough. Journal of Food Processing and Preservation, 45(10), e15869.
[37] Matti, A., Utami, T., Hidayat, C., and S. Rahayu, E. 2019. Isolation, Screening, and Identification of Proteolytic Lactic Acid Bacteria from Indigenous Chao Product. Journal of Aquatic Food Product Technology, 28(7), 781-793.
[38] Abubakr, M. A., and Al-Adiwish, W. M. 2017. Isolation and identification of lactic acid bacteria from different fruits with proteolytic activity. International Journal of Microbiology and Biotechnology, 2(2), 58-64.
[39] Ebadi Nezhad, S. J., Edalatian Dovom, M. R., Habibi Najafi, M. B., Yavarmanesh, M., and Mayo, B. 2020. Technological characteristics of Lactobacillus spp. isolated from Iranian raw milk Motal cheese. LWT, 133, 110070.
[40] da Silva, L. A., Lopes Neto, J. H. P., and Cardarelli, H. R. 2019. Safety and probiotic functionality of isolated goat milk lactic acid bacteria. Annals of Microbiology, 69(13), 1497-1505.
[41] Zareie, Z., Moayedi, A., Garavand, F., Tabar-Heydar, K., Khomeiri, M., and Maghsoudlou, Y. 2023. Probiotic Properties, Safety Assessment, and Aroma-Generating Attributes of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from Iranian Traditional Cheese. Fermentation, 9(4), 338.

[42] Lee, Y.-R., Bang, W. Y., Baek, K.-R., Kim, G.-H., Kang, M.-J., Yang, J., and Seo, S.-O. 2022. Safety Evaluation by Phenotypic and Genomic Characterization of Four Lactobacilli Strains with Probiotic Properties. Microorganisms, 10(11), 2218.

[43] Tavşanlı, H., Mus, T. E., Cetinkaya, F., Ayanoğlu, E., and Cıbık, R. 2021. Isolation of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus and Streptococcus thermophilus from nature: Technological characterisation and antibiotic resistance. Czech Journal of Food Sciences, 39(4), 305-311.

[44] de Jesus, L. C. L., de Jesus Sousa, T., Coelho-Rocha, N. D., Profeta, R., Barroso, F. A. L., Drumond, M. M., Mancha-Agresti, P., Ferreira, Ê., Brenig, B., Aburjaile, F.F., and Azevedo, V. 2022. Safety Evaluation of Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis CIDCA 133: a Health-Promoting Bacteria. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 14(5), 816-829.

[45] Pan, D., & Zhang, D. 2008. Function and safety assessment of Lactococus lactis subsp. lactis LB12 as potential probiotic strain. *African Journal of Biotechnology*, *7*(22).

[46] Cui, X., Shi, Y., Gu, S., Yan, X., Chen, H., and Ge, J. 2018. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Artisanal Milk Cheese from Northeast China Against Enteropathogenic Bacteria. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 10(4), 601-610.

[47] Palaniyandi, S. A., Damodharan, K., Suh, J.-W., and Yang, S. H. 2020. Probiotic Characterization of Cholesterol-Lowering Lactobacillus fermentum MJM60397. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 12(3), 1161-1172.

[48] Bandyopadhyay, B., Das, S., Mitra, P. K., Kundu, A., Mandal, V., Adhikary, R., Mandal, V., and Mandal, N. C. 2022. Characterization of two new strains of Lactococcus lactis for their probiotic efficacy over commercial synbiotics consortia. Brazilian Journal of Microbiology, 53(2), 903-920.

[49] Karimian, E., Moayedi, A., Khomeiri, M., Aalami, M., and Mahoonak, A. S. (2020). Application of high-GABA producing Lactobacillus plantarum isolated from traditional cabbage pickle in the production of functional fermented whey-based formulate. Journal of Food Measurement and Characterization, 14, 3408-3416.

[50] Lorencová, E., Buňková, L., Matoulková, D., Dráb, V., Pleva, P., Kubáň, V., and Buňka, F. 2012. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. International Journal of Food Science & Technology, 47(10), 2086-2091.

[51] Deepika Priyadarshani, W. M., and Rakshit, S. K. 2011. Screening selected strains of probiotic lactic acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine). International Journal of Food Science & Technology, 46(10), 2062-2069.

[52] Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Alam, R.-U., and Jahid, I. K. 2019. Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. BMC Microbiology, 19(1), 253.

[53] Wang, X., Wang, W., Lv, H., Zhang, H., Liu, Y., Zhang, M., Liu, Y., Zhang, M., Wang, Y., and Tan, Z. 2021. Probiotic Potential and Wide-spectrum Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Infant Feces. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 13(1), 90-101.

[54] Melia, S., Yuherman, J., and Purwati, E. 2018. Selection of buffalo milk lactic acid bacteria with probiotic potential. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 11(6), 186-189.

[55] Nami, Y., Panahi, B., Mohammadzadeh Jalaly, H., Vaseghi Bakhshayesh, R., and Hejazi, M. A. 2020. Application of unsupervised clustering algorithm and heat-map analysis for selection of lactic acid bacteria isolated from dairy samples based on desired probiotic properties. LWT, 118, 108839.

[56] Kalhoro, M. S., Visessanguan, W., Nguyen, L. T., and Anal, A. K. 2019. Probiotic potential of Lactobacillus paraplantarum BT-11 isolated from raw buffalo (Bubalus bubalis) milk and characterization of bacteriocin-like inhibitory substance produced. Journal of Food Processing and Preservation, 43(8), e14015.

[57] Collado, M. C., Meriluoto, J., and Salminen, S. 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. European Food Research and Technology, 226(5), 1065-1073.

[58] Mallappa, R. H., Singh, D. K., Rokana, N., Pradhan, D., Batish, V. K., & Grover, S. 2019. Screening and selection of probiotic Lactobacillus strains of Indian gut origin based on assessment of desired probiotic attributes combined with principal component and heatmap analysis. *Lwt*, *105*, 272-281.

[59] Han, Q., Kong, B., Chen, Q., Sun, F., and 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.

[60] Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., and Hojjati, M. 2021. Investigation of probiotic and technological characteristics of lactic acid bacteria isolated from native Doogh of Behbahan. Journal of Food Research, 31(4), 169-186. (In Persian)

[61] Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Wang, Y., and Zhang, H. 2010. Screening of potential probiotic properties of Lactobacillus fermentum isolated from traditional dairy products. Food Control, 21(5), 695-701.

[62] Li, Q., Liu, X., Dong, M., Zhou, J., and Wang, Y. 2015. Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. International Journal of Agricultural Policy and Research, 3(2), 84-92.

[63] Assari, F., Mojgani, N., Sanjabi, M. R., Mirdamadi, S., and Jahandar, H. 2023. Technological Assessment of Autochthonous Lactic Acid Bacteria and their Antibacterial Activities Against Food borne Pathogens in Goat Milk Lactic Cheese: LAB as biopreservative in dairy products. Applied Food Biotechnology, 10(1), 61-71.

[64] Zamani, H. 2016. Isolation of a potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* from Siahmezgi cheese and its characterization as a potentially probiotic. Biological Journal of Microorganism, 4 (16), 97-108.

[65] Kivanc, M., Yilmaz, M., Cakir, E. Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. Turkish Journal of Biology, 35(3), 313-324.

[66] Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., and Bartkiene, E. 2013. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. Food Control, 31(2), 539-545.

[67] Savadogo, A., Ouattara, C. A., Bassole, I. H., and Traore, A. S. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. Pakistan Journal of nutrition, 3(3), 174-179.

[68] Zareie, Z., Tabatabaei Yazdi, F., and Mortazavi, S. A. 2019. Optimization of gamma-aminobutyric acid production in a model system containing soy protein and inulin by Lactobacillus brevis fermentation. Journal of Food Measurement and Characterization, 13(4), 2626-2636.

[69] Iorizzo, M., Testa, B., Lombardi, S. J., Ganassi, S., Ianiro, M., Letizia, F., Succi, M., Tremonte, P., Vergalito, F., Cozzolino, A., Sorrentino, E., Coppola, R., Petrarca, S., Mancini, M., and De Cristofaro, A. 2020. Antimicrobial Activity against Paenibacillus larvae and Functional Properties of Lactiplantibacillus plantarum Strains: Potential Benefits for Honeybee Health. Antibiotics, 9(8).

[70] Monika, Savitri, Kumar, V., Kumari, A., Angmo, K., and Bhalla, T. C. 2017. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India. Journal of Food Science and Technology, 54(7), 1945-1952.

[71] Thierry, A., Pogačić, T., Weber, M., and Lortal, S. 2015. Production of Flavor Compounds by Lactic Acid Bacteria in Fermented Foods. In Biotechnology of Lactic Acid Bacteria, 314-340.

[72] García-Quintáns, N., Blancato, V. S., Repizo, G. D., Magni, C., and López, P. 2008. Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications, Chapter 3:65-88.

[73] Ribeiro, S. C., Coelho, M. C., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. M., Dapkevicius, M. L. E., and Silva, C. C. G. 2014. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. Journal of Applied Microbiology, 116(3), 573-585.

[74] Domingos-Lopes, M. F. P., Stanton, C., Ross, P. R., Dapkevicius, M. L. E., and Silva, C. C. G. 2017. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. Food Microbiology, 63, 178-190.

[75] Margalho, L. P., Feliciano, M. D. E., Silva, C. E., Abreu, J. S., Piran, M. V. F., and Sant'Ana, A. S. 2020. Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties—Insights through multivariate analysis. Journal of Dairy Science, 103(9), 7908-7926.

[76] Østlie, H. M., Helland, M. H., and Narvhus, J. A. 2003. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. International Journal of Food Microbiology, 87(1), 17-27.