ارزیابی فعالیت پروبیوتیکی و تکنولوژیکی *باسیلوس کواگولانس* (*Bacillus coagulans*) و عملکرد آن در استفاده از منابع مختلف کربنی و نیتروژنی

فاطمه خادمی[۱]، **علی مویدی***[۱]، زهرا زارعی[۱]، مرتضی خمیری[۱]، بهروز دستار[۲]

۱ گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲ گروه تغذیه دام و طیور، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۳۰

چکیده

برخی سویه‌های *باسیلوس کواگولانس* (*Bacillus coagulans*) خواص پروبیوتیک و ویژگی‌های تکنولوژیکی متعددی نشان داده‌اند که منجر به استفاده از آن‌ها در صنایع مختلف شده است. در این پژوهش برخی از این ویژگی‌ها در سویه‌های IBRC10807 (سویه T) و GBI-30,6086 (سویه SH) ارزیابی و عملکرد آن‌ها در استفاده از منابع مختلف کربنی و نیتروژنی و مقایسه شدت پروتئولیز منابع نیتروژنی بررسی گردید. نتایج نشان داد که آبگریزی سطحی برای سویه SH بالاتر بوده و تجمع *استافیلوکوکوس اورئوس* با این سویه نسبت به سویه T بیشتر بود. سویه‌ها خاصیت تجمع خودبه خودی نسبتاً خوبی را نشان دادند و قادر به رشد در حضور نمک و مقاوم به شرایط اسیدی معده بودند. علاوه بر این مشخص گردید که پروتئولیز در همه نمونه‌ها رخ داده است. اما، سویه SH در استفاده از منبع کربنی شربت ذرت و منبع نیتروژنی کنجاله سویا کارایی بالاتری را نشان داد. شرایط بهینه در این پژوهش با مطلوبیت کل ۹۵ درصد، میزان ۲/۴۶ درصد کنجاله سویا، ۱۰/۶۵ درصد شربت ذرت و مدت زمان ۳۵/۳۲ h به دست آمد. مطابق یافته این پژوهش، سویه‌های *باسیلوس کواگولانس* با خواص پروبیوتیکی و تکنولوژیکی قابل قبول، قادر به تخمیر بستره‌های ارزان قیمت کربنی و نیتروژنی جهت تولید مواد با ارزش افزوده بالا می‌باشند.

واژه‌های کلیدی : بهینه‌سازی، تخمیر، فعالیت پروتئولیتیک

* amoayedi@gau.ac.ir

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که به‌طور طبیعی در میکروبیوتای روده یافت می‌شوند. این باکتری‌ها از طریق تولید اسیدهای آلی (مانند لاکتیک اسید و استیک اسید)، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین اثرات مثبت خود را بر میزبان اعمال می‌کنند و در تقویت سیستم ایمنی نقش دارند (۱, ۲). در دهه‌های اخیر، به دلیل کاربرد پروبیوتیک‌ها در صنعت غذا، صنایع آرایشی و بهداشتی و صنعت دامپروری توجه گسترده‌ای را به خود جلب کرده‌اند (۳). با این حال، این میکروارگانیسم‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی ازجمله دمای بالا، خشکی، حضور مواد شیمیایی و اکسیژن حساس می‌باشند (۴). این محدودیت را می‌توان با استفاده از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک تشکیل‌دهنده اسپور مانند *باسیلوس کوآگولانس*[1] برطرف کرد.

باسیلوس کوآگولانس یک باکتری لاکتیکی اسپورزای گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، غیر بیماری‌زا، مقاوم در برابر گرما می‌باشد و دما و pH بهینه رشد آن به ترتیب °C ۳۵-۵۰ و ۵/۵- ۶/۵ گزارش شده است (۵). مطالعات نشان می‌دهد که برخی از سویه‌های *باسیلوس کوآگولانس* به دلیل وجود اسپور، در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک تجاری، توانایی زنده‌مانی بهتری در pH پایین، غلظت بالای صفرا، دمای بالا و شرایط معده را دارا می‌باشند (۶, ۷). علاوه بر ویژگی‌های پروبیوتیکی، *باسیلوس کوآگولانس* یک میکروارگانیسم ایده‌آل در تولید ترکیبات مختلف به ویژه لاکتیک اسید در مقیاس صنعتی است. در بسیاری از مطالعات تحقیقاتی، تولید لاکتیک اسید با استفاده از سوبستراهایی نظیر تفاله نیشکر (۸)، آب سورگوم شیرین (۹)، موسیلاژ قهوه (۱۰) و کاه گندم (۱۱) و هیدرولیز بستره‌های لیگنوسلولزی (۱۲) گزارش شده است. همچنین، در صنعت دامپروری *باسیلوس کوآگولانس* می‌تواند به هضم کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها پس از فعال شدن و جوانه زدن کمک کند و عملکرد رشد را از طریق تولید اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها و ترشح آمیلاز، زایلاناز، پروتئاز و لیپاز بهبود بخشد و قابلیت هضم خوراک را افزایش دهد. امروزه سویه‌های تجاری متعددی مانند *باسیلوس کوآگولانس* MTCC 5856در خوراک دام استفاده می‌شوند و قابلیت بالایی جهت درمان برخی بیماری‌ها دارند (۵). به عنوان مثال، گزارش شده است که *باسیلوس کوآگولانس* می‌تواند میزان اسهال را کاهش دهد و رشد و عملکرد خوکچه‌ها را بهبود بخشد (۱۳). در مطالعه دیگری که توسط لی و همکاران (۲۰۱۷) انجام شد، فعالیت پروبیوتیکی *باسیلوس‌های* جدا شده از سس سویای سنتی کره‌ای ارزیابی شد. در این پژوهش مشخص گردید که سه سویه (MKSK M1, MKSK J1, MKSK E1) به شرایط دستگاه گوارش کاملاً مقاوم بوده و دارای فعالیت ضد میکروبی در برابر *باسیلوس سرئوس*[2]، *لیستریا مونوسیتوژنز*[3]، *استافیلوکوکوس اورئوس*[4] و *اشرشیا کلی*[5] می‌باشند، از این رو می‌توانند به‌عنوان پروبیوتیک در غذاهای فراسودمند و حیوانی استفاده شوند (۱۴).

در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی در جهت بهبود مدیریت پسماند با هدف کاهش اثرات منفی زیست‌محیطی و تقویت اقتصاد زیستی شده است. در این راستا استفاده از پسماندها و بستره‌های صنعتی ارزان قیمت در تخمیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۵-۱۷). علاوه بر تخمیرهای با واسطه

[1] *Bacillus coagulans*

[2] *Bacillus cereus*

[3] *Listeria monocytogenes*

[4] *Staphylococcus aureus*

[5] *Escherichia coli*

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

باکتری‌های لاکتیک اسید، که جز پرکاربردترین باکتری‌های تخمیرکننده هستند، سایر باکتری‌ها از جمله گونه‌های *باسیلوس* برای ارزش بخشیدن به محصولات ثانویه گیاهی استفاده شده‌اند. به عنوان مثال، *باسیلوس کوآگولانس*، *باسیلوس آمیلو لیکویی فاشینز* ۶، *باسیلوس لیکنی فرمیس* ۷ و *باسیلوس سوبتیلیس* ۸ به تنهایی یا همراه با سایر باکتری‌ها و قارچ‌ها برای تخمیر محصولات مشتق شده از برنج، سویا، بلوط، میوه و سورگوم به کار گرفته شده‌اند (۲۱-۱۸). با این حال، بسیاری از ویژگی‌های عملکردی و تکنولوژیکی باکتری‌ها، وابسته به سویه است. بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی و قابلیت‌های تکنولوژیکی سویه‌های مختلف *باسیلوس کوآگولانس* (IBRC10807 و GBI-30,6086) برای استفاده از بستره‌های مقرون به صرفه بود.

مواد و روش‌ها

مواد

دو سویه *باسیلوس کوآگولانس* IBRC10807 از شرکت تک ژن زیست (سویه T) و GBI-30,6086 از شرکت فراورده‌های زیستی پردیس رشد مهرگان شیراز (سویه SH) خریداری گردید. پسماند و بستره‌های ارزان قیمت از گروه علوم دام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و شیره انگور از بازار محلی (گرگان) خریداری شد. پپسین و نمک صفراوی از شرکت تتراکم (ایران) و تریپسین از شرکت Bio Basic (کانادا) خریداری شد.

آب‌گریزی سطحی[9]

برای این منظور، ۳ ml از سوسپانسیون باکتریایی *باسیلوس کواگولانس* (نیم مک‌فارلند) به ۱ ml هگزان اضافه و مخلوط گردید. سپس مخلوط در ۳۷ °C و بدون هم‌زدن به‌مدت ۳ h گرمخانه‌گذاری شد. پس از جداسازی هگزان، جذب فاز آبی در ۶۰۰ nm اندازه‌گیری و آب‌گریزی سطح طبق فرمول زیر تعیین شد (۲۶):

$$\text{Hydrophobicity (\%)} = [1 - (A_{Final}/A_{Initial}) \times 100]$$

در این فرمول، $A_{initial}$ و A_{final} به ترتیب جذب اولیه و نهایی می‌باشند.

هم تجمعی[10]

درصد هم‌تجمعی مشابه روش آرماس[11] و همکاران (۲۰۱۷) و پولاک[12] و همکاران (۲۰۱۴) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب که، پس از تنظیم جمعیت (نیم مک‌فارلند)، ml ۱ از هر سویه و باکتری‌های بیماری‌زا (*اشرشیا کلی*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*[13]، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز*) مخلوط، به مدت ۲ h در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شدند. سپس جذب هر یک در ۶۰۰ nm اندازه‌گیری و درصد هم تجمعی مطابق با فرمول زیر محاسبه گردید (۲۴, ۲۵):

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

در این فرمول، A_x، A_y و A_{x+y} به ترتیب جذب سویه پروبیوتیک، بیماری‌زا و مخلوط پروبیوتیک و بیماری‌زا می‌باشند.

تجمع خودبخودی[14]

جهت اندازه‌گیری تجمع خودبخودی، جذب کشت فعال باکتریایی بر روی ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد (OD_i). سپس به مدت ۲ h گرمخانه‌گذاری و مجدد جذب اندازه‌گیری شد (OD_{2h}). درصد تجمع خودبه‌خودی طبق فرمول زیر محاسبه شد (۲۳):

$$\text{Auto-aggregation} = [1- (OD_{2h}/OD_i)] \times 100$$

تحمل نمک

برای انجام آزمون تحمل نمک، مشابه سریناد[15] و همکاران (۲۰۲۲)، عمل شد (۲۷). سویه‌ها بر روی نوترینت آگار حاوی غلظت‌های مختلف NaCl (۱، ۳، ۵ و ۷ درصد وزنی/حجمی)، به صورت سطحی بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد و سپس به مدت ۲۴-۷۲ h گرمخانه‌گذاری شد و نتیجه به صورت کیفی بررسی شد.

مقاومت به اسید

[6] *Bacillus amyloliquefaciens*
[7] *Bacillus licheniformis*
[8] *Bacillus subtilis*
[9] Hydrophobicity
[10] Co-aggregation
[11] Armas
[12] Polak
[13] *Salmonella typhimurium*
[14] Auto-aggregation
[15] Sreenadh

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

برای انجام این آزمایش مشابه با روش چانگ[16] و همکاران (۱۹۹۹)، عمل شد (۲۸). بافر سدیم فسفات[17] (PBS) تهیه و استریل شد. در مرحله بعد، µl ۱۰۰ از کشت فعال سویه *باسیلوس کواگولانس* به ml ۵ بافر فسفات (mM ۵۰ و۷ =pH) و محلول با pHهای ۲ و ۳ تلقیح و گرمخانه‌گذاری شد. سپس جهت تعیین جمعیت باکتری‌های زنده در زمان-های h ۰، ۱ و ۲، به صورت سطحی بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد و در نهایت پلیت‌ها پس از h ۲۴ گرمخانه‌گذاری، شمارش شدند.

مقاومت به پپسین

مشابه با روش چوکای[18] و همکاران (۲۰۱۴)، سویه‌های باکتریایی به میزان µl ۱۰۰ به ml ۵ محیط شبیه‌سازی شده معده که حاوی ۰/۳ درصد پپسین در بافر PBS (pH=۲) بود، تلقیح شد. سوسپانسیون به مدت min ۰، ۹۰ و ۱۸۰ گرمخانه گذاری گردید و در فواصل زمانی مذکور به صورت سطحی بر روی محیط نوترینت آگار صورت پذیرفت. در نهایت پس از h ۲۴ گرمخانه گذاری در دمای °C ۳۷ سلول‌ها شمارش شدند (۲۹).

مقاومت به تریپسین

آزمون تریپسین مشابه روش گلو[19] و همکاران (۲۰۰۹)، با اندکی تغییرات انجام گرفت (۳۰). محلول PBS تهیه و pH آن روی ۸ تنظیم گردید. محلول ۱ درصد از تریپسین تهیه و با فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرومتر، فیلتر و سپس حجم آن با PBS استریل روی ml ۵۰ تنظیم شد. ۱ درصد از کشت باکتریایی فعال به محلول تلقیح و به مدت h ۱، ۳ و ۶ در دمای °C ۳۷ گرمخانه‌گذاری شد. رقت سازی سریالی در زمان‌های مختلف تهیه و پس از کشت سطحی بر روی محیط کشت نوترینت آگار، در دمای °C ۳۷ گرمخانه‌گذاری، سپس شمارش سلولی انجام شد.

تحمل نمک صفراوی

به منظور تعیین تحمل نمک صفراوی هریک از سویه های مورد مطالعه، ابتدا سویه‌های ذخیره شده در گلیسرول ۲۰ درصد به مدت h ۲۴ در محیط نوترینت براث در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد فعال شدند. سپس در ۱ درصد کشت فعال باکتریایی به محیط حاوی نوترینت براث و ۰/۳ درصد نمک صفراوی استریل تلقیح شد و منظور شمارش باکتریهای زنده پس از h ۰، ۲ و ۴ گرمخانه‌گذاری در دمای °C ۳۷ و سپس رقت‌های متوالی تهیه و دو رقت متوالی کشت سطحی داده شد. پلیت‌ها در دمای °C ۳۷ گرمخانه گذاری و شمارش شدند (۲۲).

مقاومت گرمایی

برای این منظور از روش پالوپ[20] و همکاران (۱۹۹۶)، با اندکی تغییرات استفاده گردید. پس از رشد h ۲۴ باکتری *باسیلوس کواگولانس* و تنظیم جمعیت (نیم مک‌فارلند)، لحظه صفر بر روی نوترینت آگار کشت داده شد. سپس همان نمونه به مدت min ۲۰ در بن ماری °C ۱۰۰ (نقطه‌جوش) قرار داده شد. پس از گذشت min ۲۰، جهت شمارش جمعیت باکتری‌های زنده بر روی محیط نوترینت آگار به صورت سطحی کشت داده شد، و پلیت‌ها به مدت h ۲۴در دمای °C ۳۷، گرمخانه گذاری شدند (۳۱).

شمارش اسپور

برای انجام این آزمون از روش سنیک[21] و همکاران (۱۹۸۹)، استفاده شد (۳۵). کشت h ۲۴ باکتریایی به منظور تخریب سلول‌های رویشی به مدت min ۴۰ در دمای °C ۶۳ حرارت داده شد. سپس بلافاصله سوسپانسیون به درون یخچال با دمای °C ۴ منتقل و پس از خنک شدن، کشت داده شد. در نهایت پلیت‌ها به مدت h ۲۴ گرمخانه گذاری شده و شمارش شدند.

بررسی توانایی استفاده از منابع کربنی مختلف

برای این منظور، محیط کشت حاوی ۰/۵ درصد سدیم کلرید و ۰/۸ درصد عصاره مخمر (به صورت ثابت) و ۱۵ درصد قند از منابع کربوهیدراتی مختلف مانند شیره خرما، شیره انگور، شربت ذرت، گلوکز صنعتی و ملاس چغندرقند به صورت متغیر و مجزا در بافر PBS (mM ۵۰ با pH=۶/۵) تهیه شد. منبع پروتئینی (عصاره مخمر+ NaCl) و منبع قندی، ابتدا

[16] Chung
[17] Phosphate-buffered saline (PBS)
[18] Chu-Ky
[19] Guo
[20] Palop
[21] Senyk

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

هرکدام به صورت جداگانه با بافر فسفات تهیه و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند و با یکدیگر مخلوط و ۲ درصد کشت باکتریایی، به آن‌ها تلقیح شد. pH لحظه صفر نمونه‌ها و کنترل بعد از اختلاط و تلقیح اندازه‌گیری شد. سپس قبل از گرمخانه گذاری از نمونه‌ها به‌صورت سریالی بر نوترینت آگارکشت داده شد و همان نمونه‌های اصلی(سوسپانسیون اولیه) و پلیت‌های کشت داده شده به مدت h ۲۴ در دمای ^{o}C ۳۷، گرم‌خانه گذاری و شمارش شدند. pH محلول تخمیر و نمونه کنترل مجدداً اندازه‌گیری و کشت داده شدند.

بررسی توانایی استفاده از منابع نیتروژنی مختلف

جهت بررسی توانایی استفاده از منابع پروتئینی، مشابه روش الاجویبه و آهیوسان[22] (۲۰۱۳) با تغییرات مورد نیاز عمل شد (۳۲). برای این منظور محیط کشت حاوی ۲ درصد منبع قندی ثابت (گلوکز ۱۸ درصد) و ۱/۵ درصد از منابع پروتئینی مختلف (به صورت مجزا)، از جمله کنجاله کنجد، کنجاله سویا و گلوتن ذرت در PBS (۵۰ mM با pH=۶/۵) تهیه و پس از استریل کردن با ۲ درصد کشت باکتریایی، تلقیح شد. پس از تلقیح، pH لحظه صفر همه نمونه‌ها اندازه‌گیری و کشت داده شد. پس از h ۲۴ گرمخانه‌گذاری، pH سوسپانسیون باکتریایی و نمونه کنترل مجدد اندازه‌گیری گردید و کشت سلولی صورت پذیرفت. در طول مدت گرمخانه‌گذاری، تغییرات محتوای آمینواسید آزاد (با روش معرف اورتوفتال دی آلدهید – OPA[23]) به‌عنوان معیاری از قدرت پروتئولیزی سویه‌ها و شمارش سلولی ارزیابی شدند.

شدت پروتئولیز منابع نیتروژنی

مطابق روش دونکار[24] و همکاران (۲۰۰۷) و چرچ[25] و همکاران (۱۹۸۳)، میزان پروتئولیز در حین تخمیر بر اساس واکنش گروه‌های آمین آزاد با OPA تعیین شد. هر محیط با محلول تری کلرواستیک اسید ۵ درصد مخلوط و سانتریفیوژ شد و روماند حاصل پس از صاف شدن با کاغذ صافی برای اندازه‌گیری میزان پروتئولیز مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور محلول صاف شده با محلول OPA مخلوط و جذب نمونه در طول‌موج nm ۳۴۰ اندازه‌گیری شد (۳۳, ۳۴).

آماده‌سازی محلول OPA مشابه روش چرچ و همکاران (۱۹۸۳) با اندکی تغییر انجام شد (۳۳). در یک بالون حجمی محلول بوراکس mM ۱۰۰ و محلول سدیم دودسیل سولفات ریخته شد. ماده خالص اورتوفتال دی آلدهید در متانول خالص حل و به بالون حجمی مذکور افزوده شد. در انتها DTT به مخلوط اضافه و حجم نهایی با آب مقطر به ml ۵۰ رسانده شد. محلول در محیط تاریک نگهداری شد و تا حداکثر min ۳۰ پس از آماده‌سازی مورد استفاده قرار گرفت.

بهینه‌سازی

پس از تعیین منابع بهینه کربن و نیتروژن و سویه مناسب، توسط روش سطح پاسخ[26] (RSM)، طرح پیشنهادی تهیه شد و با توجه به فاکتورهای رشد، محیط‌های کشت برای انجام تخمیر و تولید اسید در مدت زمان بهینه رشد، گرمخانه گذاری شده و پس از زمان‌های تعیین شده، pH اندازه‌گیری و مطابق با روش‌های قبل کشت و شمارش شدند.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری کلیه داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار مینی‌تب[27] انجام شد. به منظور بررسی روند تغییرات جمعیت باکتریایی در تیمارهای مربوطه از تجزیه واریانس (ANOVA) برای آزمون های تکرار شونده در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.مقایسه میانگین بین دو تیمار باکتریایی به چه روشی انجام شد؟؟/

نتایج

ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی سویه‌ها

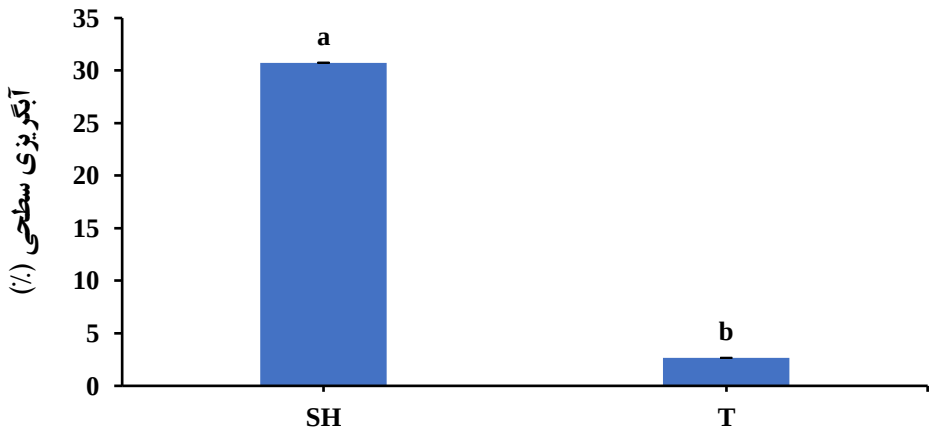
آبگریزی سطحی

نتایج آبگریزی سطحی سویه‌های *باسیلوس کواگولانس* در نمودار ۱ ارائه شده است. مطابق نتایج، اختلاف معناداری بین میزان آبگریزی سطحی سویه‌ها مشاهده گردید و آبگریزی

[22] Olajuyigbe & Ehiosun
[23] *O*-phtaldialdehydes
[24] Donkor
[25] Church
[26] Response surface methodology
[27] Minitab

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

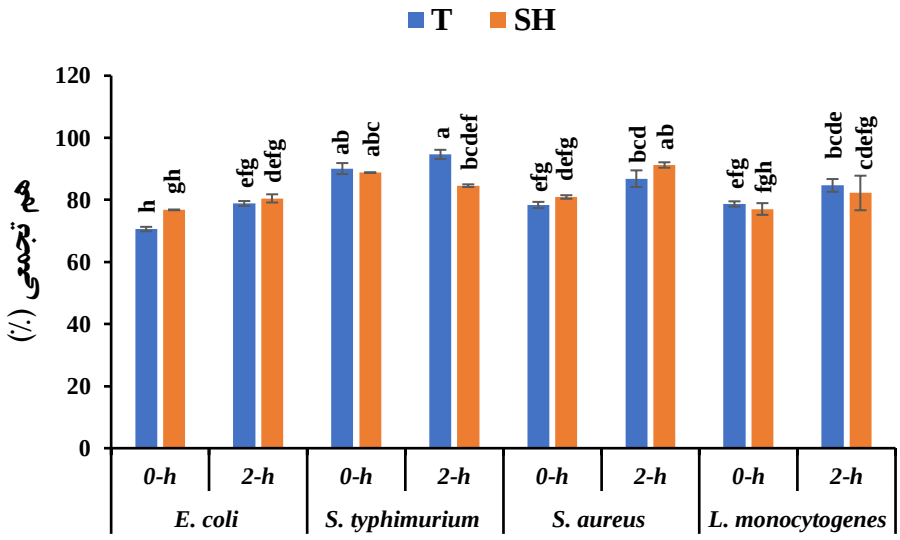
سطحی برای سویه‌های T و SH به ترتیب برابر با ۲/۶۶ و ۳۰/۷۴ درصد بود.



نمودار ۱- میزان آبگریزی سطحی سویه‌های *باسیلوس کواگولانس* استفاده شده در این پژوهش.
(حروف کوچک غیر مشابه نشان دهنده وجود تفاوت معنادار بین میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p < ۰/۰۵) می‌باشد)

هم‌تجمعی

ظرفیت هم‌تجمعی سویه‌های SH و T با باکتری‌های بیماری‌زا در نمودار ۲ گزارش شده است. مشاهده می‌شود که تجمع *استافیلوکوکوس اورئوس* با سویه SH نسبت به سویه T بیشتر و با نتایج *اشرشیا کلی* مشابه بوده و با یکدیگر اختلاف معناداری نشان ندادند. همچنین هم‌تجمعی *سالمونلا تیفی-موریم* با سویه T به نسبت سویه SH و دیگر بیماری‌زاها بسیار چشمگیر بود. اما درصد هم‌تجمعی *لیستریا مونوسیتوژنز* با هر دو سویه تفاوت معناداری با یکدیگر نداشته و نتایج حاکی از توانایی هم تجمعی کمتری نسبت به دیگر پاتوژن‌ها بود.

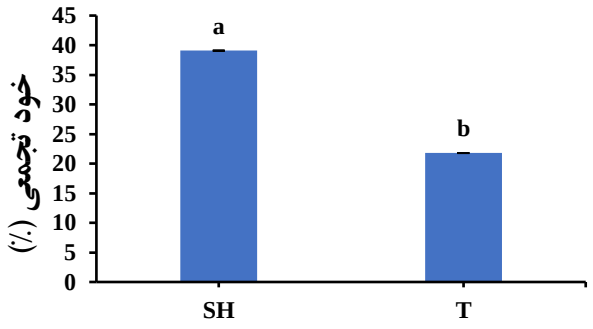


نمودار ۲- درصد هم تجمعی سویه‌های *باسیلوس کواگولانس* استفاده شده در این پژوهش.
(حروف کوچک غیر مشابه نشان دهنده وجود تفاوت معنادار بین میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p < ۰/۰۵) می‌باشد)

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

خودتجمعی

سویه‌های *باسیلوس کواگولانس* خاصیت تجمع خودبه خودی نسبتاً خوبی را از خود نشان دادند (نمودار ۳). درصد خودتجمعی سویه SH برابر با ۳۹ درصد بود که نسبت به سویه T با ۲۲ درصد خاصیت خودتجمعی، اختلاف معناداری نشان داد.



نمودار ۳- میزان خود تجمعی سویه‌های *باسیلوس کواگولانس* استفاده شده در این پژوهش.
(حروف آماری غیر مشابه نشان دهنده وجود تفاوت آماری بین میانگین نتایج در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p < ۰/۰۵) می‌باشد)

تحمل نمک

نتایج بررسی اثر نمک بر زنده‌مانی سویه‌های *باسیلوس کواگولانس* نشان داد که هر دو سویه SH و T قادر به رشد در حضور ۱-۵ درصد NaCl می‌باشند. با اینحال افزایش غلظت نمک سدیم کلرید سبب کاهش رشد سویه‌ها گردید و پس از ۷۲ h گرمخانه گذاری هیچ رشد قابل‌توجهی در حضور غلظت‌های ۷ و ۱۰ درصد نمک مشاهده نشد.

جدول ۱- زنده‌مانی سویه‌های باسیلوس کواگولانس در حضور غلظت‌های مختلف نمک.

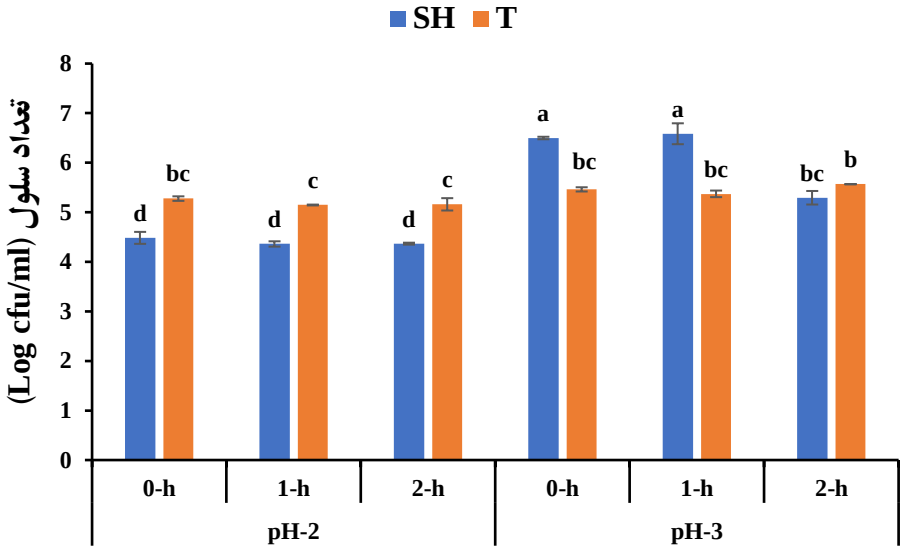
سویه	غلظت نمک (٪)				
	۱	۳	۵	۷	۱۰
SH	+	+	+	-	-
T	+	+	+	-	-

+ رشد؛ - عدم رشد.

تحمل به اسید

زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش برای بررسی مقاومت باکتری‌ها به شرایط اسیدی و زنده‌مانی آن‌ها در pHهای پایین مورد بررسی قرارگرفت (نمودار ۴). در ابتدا به طور متوسط log CFU/ml ۶/۴۹، پروبیوتیک زنده (سویه SH) در محیط با pH= ۳ وجود داشت. پس از ۱ h قرارگرفتن در معرض شرایط اسیدی، این تعداد به log CFU/ml ۶/۶ افزایش یافت. اما پس از گذشت ۲ h از تعداد سلول‌های زنده به log CFU/ml ۵/۳ کاهش یافت. درصورتی‌که زنده‌مانی سویه T از log CFU/ml ۵/۴۶ پس از گذشت ۲ h قرارگرفتن در معرض pH= ۳ به log CFU/ml ۵/۵۶ افزایش یافت. در pH= ۲، زنده‌مانی سویه T با کاهش حداقلی از log CFU/ml ۵/۲۷ به log CFU/ml ۵/۱۶ و زنده‌مانی سویه SH با کاهش از log CFU/ml ۴/۴۸ به log CFU/ml ۴/۳۷ پایداری این دو سویه در این شرایط اسیدی را نشان داد.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

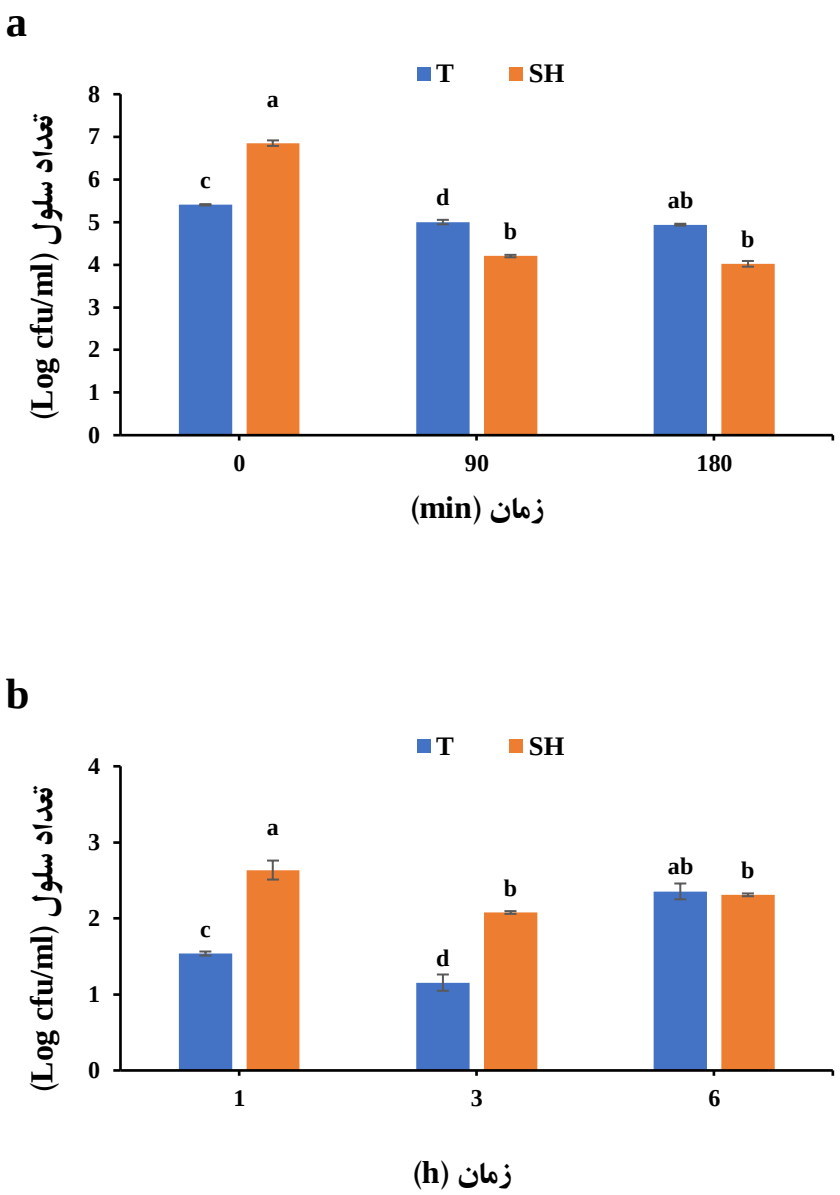


نمودار ٤- زنده‌مانی سویه‌های *باسیلوس کواگولانس* تحت شرایط شبیه‌سازی شده اسید معده.
حروف کوچک غیر مشابه نشان دهنده وجود تفاوت آماری بین میانگین نتایج در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p < ۰/۰۵) می‌باشد.

مقاومت به آنزیم‌های پروتئولیتیک پپسین و تریپسین

نتایج نشان می‌دهد که هر دو سویه مورد بررسی در محیط حاوی ۰/۳ درصد پپسین و در طی زمان‌های min ۹۰ و ۱۸۰، زنده مانده‌اند و در نتیجه این سویه‌ها مقاوم به شرایط اسیدی معده هستند (نمودار a–۵). در مقایسه بین دو سویه، سویه Tدر طی گذشت زمان، مقاومت بهتری نسبت به سویه SH از خود نشان داد. سویه‌های باکتریایی منتخب با تعداد تقریبی log CFU/ml ۶ وارد شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش شدند. پس از قرارگرفتن در معرض پپسین، حدود log CFU/ml ۲ کاهش یافت، با این حال همچنان تقریباً log CFU/ml ۴/۵ در طی زمان‌های min ۹۰ و ۱۸۰، زنده مانده‌اند. در نتیجه این سویه‌ها توانسته‌اند در این شرایط گوارشی مقاومت کرده و از این قسمت از دستگاه گوارش به‌خوبی عبور کنند. در مقایسه بین دو سویه، سویه T در طی گذشت زمان، مقاومت بهتری نسبت به سویه SH از خود نشان داد.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]



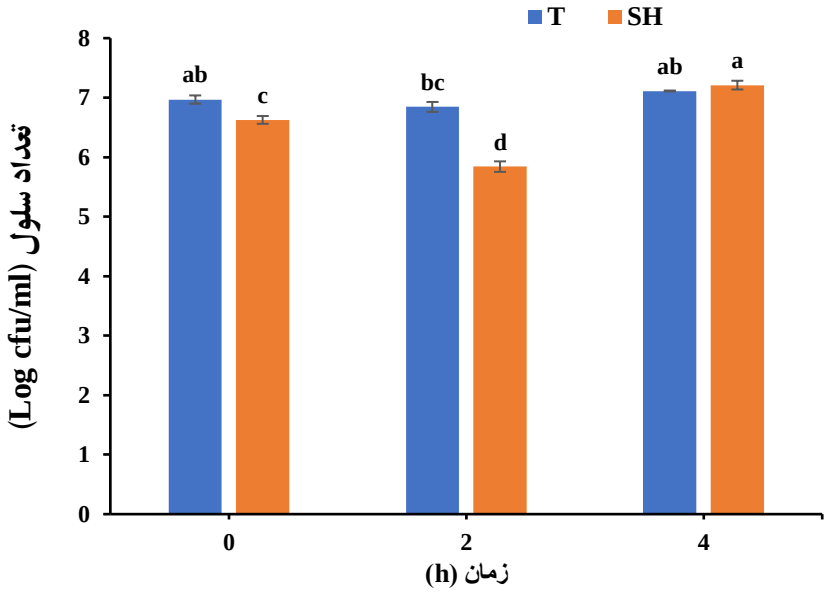
نمودار ۵- زنده‌مانی سویه‌های *باسیلوس کواگولانس* در حضور آنزیم پپسین (a) و تریپسین (b).
(حروف کوچک غیر مشابه نشان دهنده وجود تفاوت آماری بین میانگین نتایج در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p < ۰/۰۵$) می‌باشد)

نتایج نشان می‌دهد که سویه‌های مورد بررسی در شرایط وجود تریپسین نیز در زمان‌های h ۱، ۳ و ۶ مقاوم بوده و زنده مانده‌اند (نمودار b-۵). به این صورت که در زمان h ۱، مقاومت سویه SH بیشتر بوده ولی طی گذشت h ۶ سویه T زنده‌مانی بهتری را از خود نشان داد.

تحمل به نمک صفراوی

مطابق نتایج ارائه شده در نمودار ۶، سویه‌های مورد مطالعه نسبت به نمک صفراوی تحمل خوبی نشان دادند. به‌طوریکه، سویه SH بیشترین تحمل را به ۰/۳ درصد نمک صفراوی در زمان h ۴ نسبت به سویه T نشان داد، در حالیکه این سویه در زمان h ۲ کمترین مقاومت را نشان داد.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

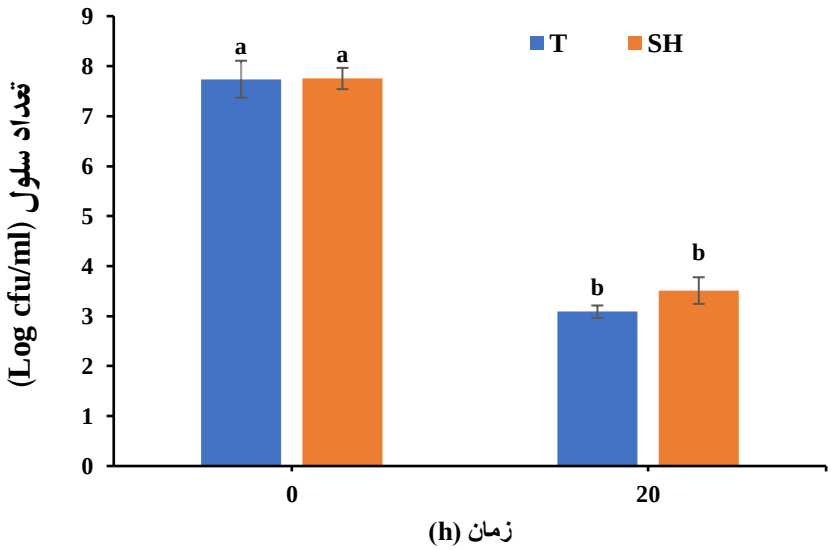


نمودار ٦- زنده‌مانی سویه‌های *باسیلوس کواگولانس* در حضور نمک صفراوی.

(حروف آماری غیر مشابه نشان دهنده وجود تفاوت آماری بین میانگین نتایج در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p < ۰/۰۵) می‌باشد)

مقاومت گرمایی

نتایج مقاومت گرمایی سویه‌ها نشان داد که در ساعت صفر سویه‌ها حدود ۷/۸ log CFU/ml رشد داشتند اما پس از ۲۰ min حرارت‌دهی، زنده‌مانی سویه‌ها به صورت معنی‌داری حدود ۳ log CFU/ml کاهش یافت (نمودار ۷). در مقایسه بین سویه‌ها، سویه SH نسبت به سویه T، کاهش کمتری مشاهده شد.



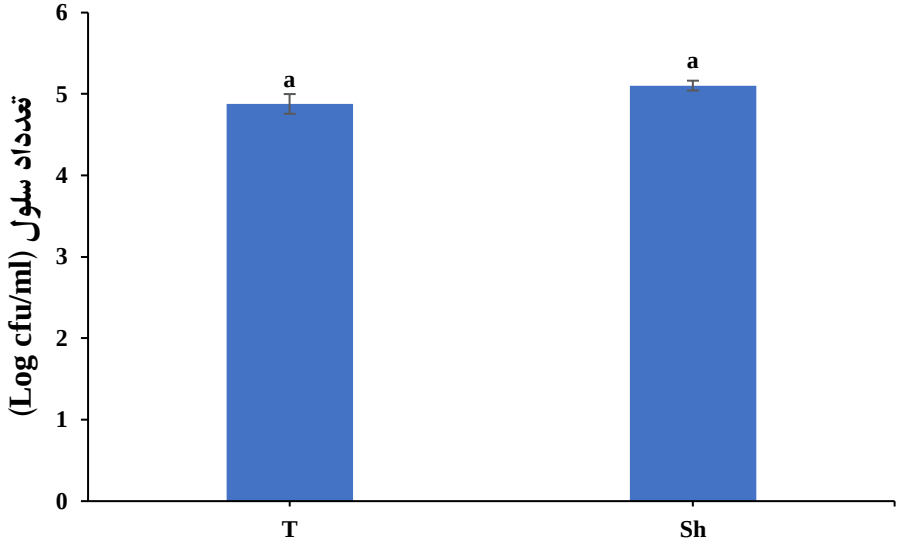
نمودار ۷- مقاومت گرمایی سویه‌های *باسیلوس کواگولانس*.

(حروف آماری غیر مشابه نشان دهنده وجود تفاوت آماری بین میانگین نتایج در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p < ۰/۰۵) می‌باشد)

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

خاصیت اسپورزایی

هر دو سویه مورد بررسی دارای خاصیت اسپورزایی بودند (نمودار ۸) و میزان log CFU/ml ۵/۱ و ۴/۹ سلول به ترتیب برای سویه‌های SH و T مشاهده گردید (p > ۰/۰۵).

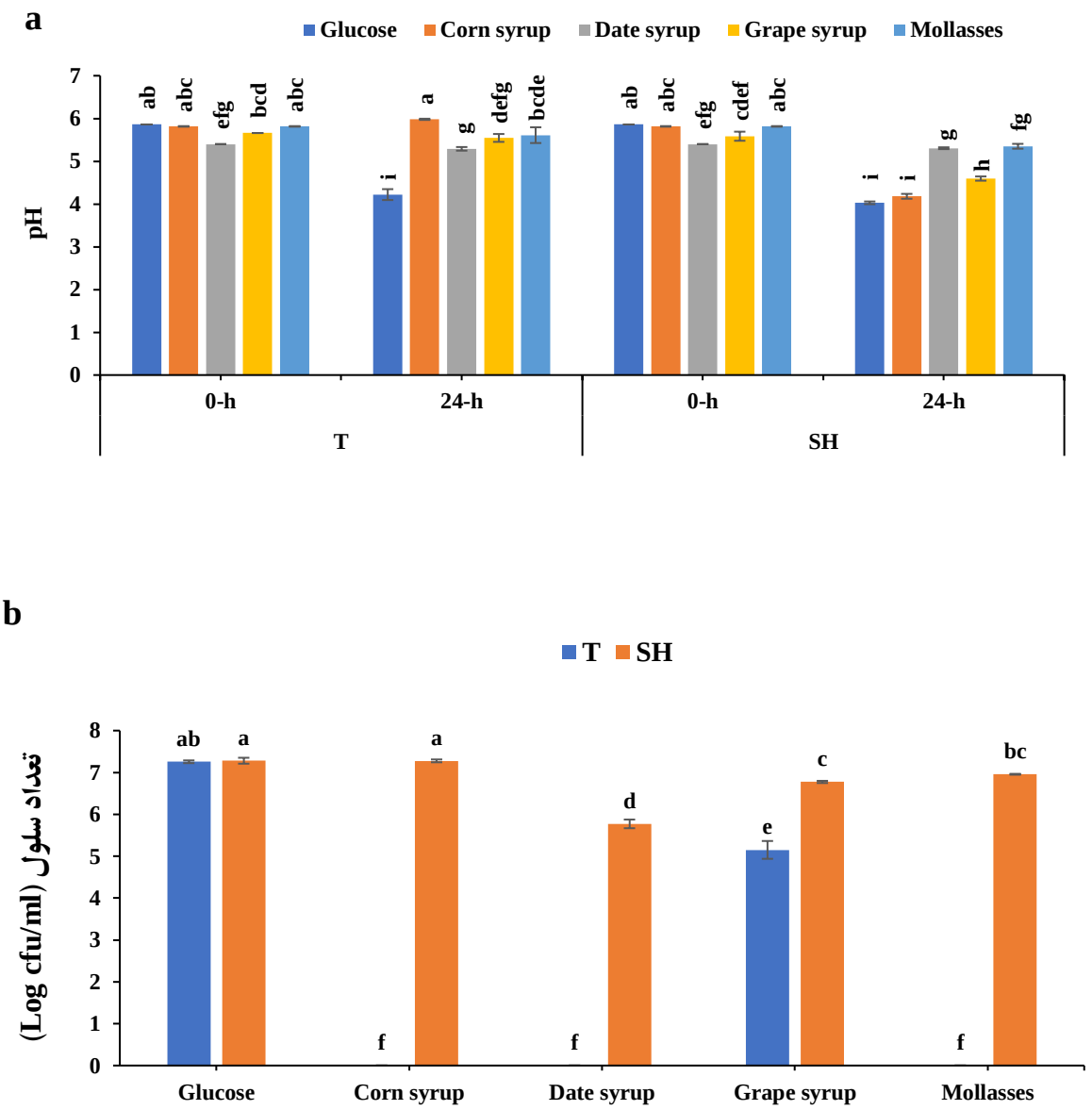


نمودار ۸- خاصیت اسپورزایی سویه‌های *باسیلوس کواگولانس*.
(حروف آماری غیر مشابه نشان دهنده وجود تفاوت آماری بین میانگین نتایج در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p < ۰/۰۵) می‌باشد)

تخمیر منابع کربنی

پتانسیل کاهش pH توسط دو سویه مورد آزمایش، در نمودار a-۹ نشان داده شده است. با شاهد در نظر گرفتن تیمار حاوی گلوکز، بیشترین کاهش pH پس از ۲۴ h گرمخانه گذاری، مربوط به تیمار شربت ذرت تخمیر شده با سویه SH بود و کمترین تغییر در تیمار شربت ذرت تخمیر شده با سویه T مشاهده گردید که نشان می‌دهد این سویه قادر به تخمیر این منبع کربنی نبوده است. نتایج بررسی شمارش سلولی پس از ۲۴ h تخمیر (نمودار b-۹) نیز نشان داد که بسترهای مورد بررسی سویه SH قادر به رشد بیشتری در در مقایسه با سویه T بود به گونه‌ای که که بیشترین تعداد سلول در شربت ذرت تخمیر شده با سویه SH به دست آمد. همچنین لازم به ذکر است که در زمان صفر هیچ سلولی در محیط‌های تخمیر شده مشاهده نشد.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]



نمودار ۹- تغییرات pH در زمان صفر و بعد از ۲٤ h تخمیر (a) و تعداد سلول بعد از ۲٤ h تخمیر (b) در منابع مختلف کربنی تخمیر شده با سویه‌های باسیلوس کواگولانس.

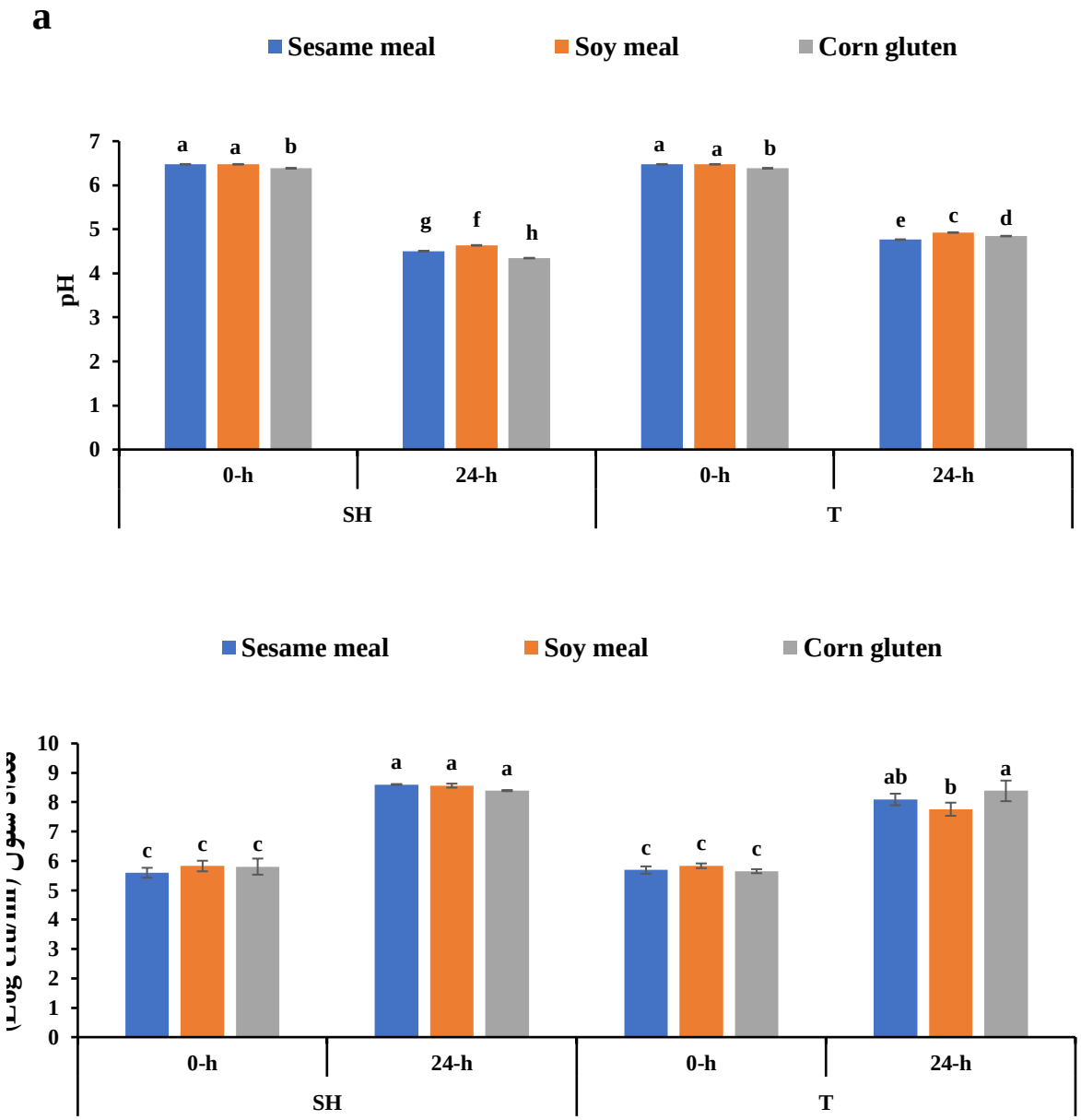
(حروف آماری غیر مشابه نشان دهنده وجود تفاوت آماری بین میانگین نتایج در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p < ۰/۰۵) می‌باشد)

تخمیر منابع پروتئینی

میزان پروتئولیز در طول تخمیر به طور کلی به عنوان درجه هیدرولیز به درصد کل پیوندهای پپتیدی شکافته شده توسط سیستم آنزیمی تعیین شد. در طی تخمیر محیط‌های حاوی منابع نیتروژنی (کنجاله سویا، کنجاله کنجد، گلوتن ذرت) و یک منبع قندی مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج بسته به سویه، متغیر بود. در طی این آزمایش، pH و شمارش سلولی طی ۲۴ h مورد بررسی قرار گرفت (نمودار ۱۰). نتایج برای بررسی pH، به این صورت بود که در طی ۲۴ h، بیشترین کاهش pH مربوط به تیمار حاوی سویه SH + گلوتن ذرت و سپس تیمارهای حاوی سویه SH + کنجاله کنجد و SH + کنجاله سویا بود (نمودار a-۱۰). در بررسی شمارش سلولی، نتایج نشان داد که، بیشترین رشد پس از ۲۴ h کشت سطحی، مربوط به تیمار سویه SH + کنجاله کنجد و سپس تیمار سویه

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

SH + کنجاله سویا بوده است (نمودار b–۱۰). همچنین سویه T، به نسبت سویه SH قدرت تخمیر و فعالیت پروتئولیتیکی کمتری را هم در بررسی pH و هم شمارش سلولی، از خود نشان داد.



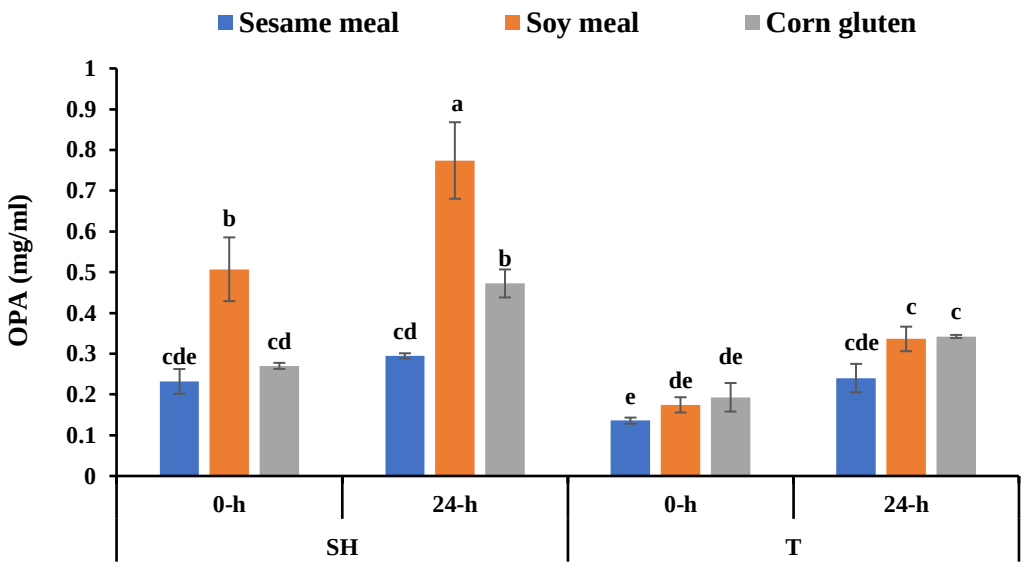
نمودار ۱۰- تغییرات pH در زمان صفر و بعد از ۲٤ h تخمیر (a) و تعداد سلول (b) در زمان صفر و بعد از ۲٤ h تخمیر در منابع مختلف پروتئینی تخمیر شده با سویه‌های باسیلوس کواگولانس.
(حروف آماری غیر مشابه نشان دهنده وجود تفاوت آماری بین میانگین نتایج در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p < ۰/۰۵) می‌باشد)

شدت پروتئولیز منابع نیتروژنی

نتایج حاصل از آنالیز واریانس داده‌های مربوط به بررسی فعالیت پروتئولیتیک در نمودار ۱۱ نشان داده شده است. فعالیت پروتئولیتیک با استفاده از روش OPA، بر اساس اندازه‌گیری گروه‌های آمین آزاد در طول فرایند تخمیر ارزیابی شد. نتایج نشان داد که پروتئولیز در همه نمونه‌ها رخ

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

داده است و هر دو سویه مورد نظر قادر به انجام هیدرولیز بوده‌اند. در بین تیمارها، بیشترین و کمترین پروتئولیز مربوط به نمونه تیمار کنجاله سویا و سویه SH و کنجاله کنجد و سویه T بود.



نمودار ۱۱- غلظت گروه آمین آزاد در زمان صفر و بعد از ۲٤ h تخمیر در منابع مختلف پروتئینی تخمیر شده با سویه‌های *باسیلوس کواگولانس*.

(حروف آماری غیر مشابه نشان دهنده وجود تفاوت آماری بین میانگین نتایج در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p < ۰/۰۵$) می‌باشد)

بهینه‌سازی

در این مطالعه سه فاکتور غلظت شربت ذرت (به عنوان منبع کربنی و در سه سطح ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد)، کنجاله سویا (به عنوان منبع پروتئینی و در سه سطح ۱، ۱/۷۵ و ۲/۵ درصد) و مدت زمان تخمیر (در سه سطح h ۱۲، ۲۴ و ۳۶) با به‌کارگیری روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۲). در این طرح ۱۷ تیمار همراه با ۳ نقطه مرکزی در جهت برآورد عدم تطابق و تکرارپذیری در نظر گرفته شد. کنجاله سویا، شربت ذرت و زمان تخمیر به‌عنوان عوامل مؤثر تخمیر و متغیرهای مستقل با نقاط حداکثر، میانی و حداقل طرح سطح پاسخ ارائه شدند. اندازه‌گیری pH نهایی تخمیر و شمارش سلولی آن‌ها پس از زمان‌های تعیین شده، از فاکتورهای (متغیرهای) وابسته مورد بررسی بودند.

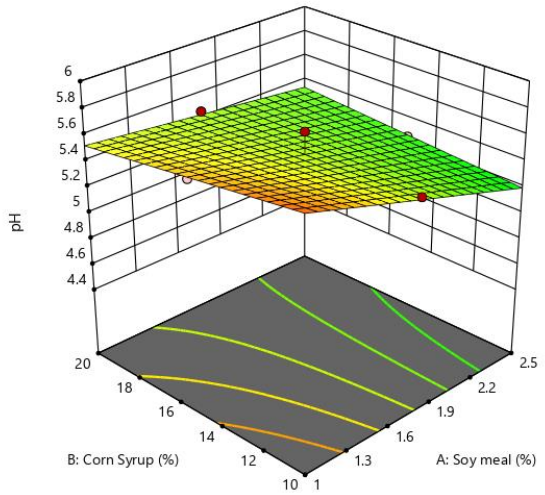
[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

جدول ۲- تعداد تیمارها و سطوح متغیرهای مستقل مطابق روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی.

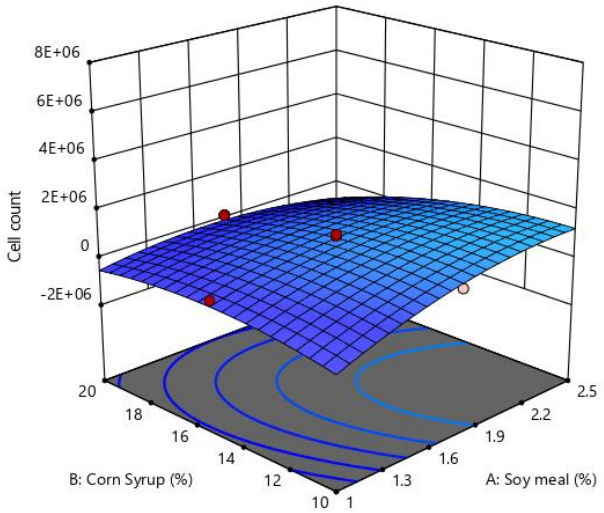
تیمار	زمان تخمیر (C, h)	شربت ذرت (B, %)	کنجاله سویا (A, %)
۱	۱۲	۲۰	۲/۵
۲	۱۲	۱۵	۱/۷۵
۳	۲۴	۱۵	۱/۷۵
٤	۲۴	۱۵	۱
٥	۳۶	۱۰	۲/۵
٦	۲۴	۲۰	۱/۷۵
۷	۲۴	۱۵	۱/۷۵
۸	۳۶	۱۵	۱/۷۵
۹	۲۴	۱۵	۱/۷۵
۱۰	۱۲	۲۰	۱
۱۱	۳۶	۲۰	۱
۱۲	۳۶	۲۰	۲/۵
۱۳	۲۴	۱۵	۲/۵
۱٤	۱۲	۱۰	۲/۵
۱٥	۳۶	۱۰	۱
۱٦	۱۲	۱۰	۱
۱۷	۲۴	۱۰	۱/۷۵

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

a



b



نمودار ۱۲- تغییرات pH (a) و شمارش سلولی (b) بصورت تابعی از کنجاله سویا و شربت ذرت تخمیر شده با سویه SH *باسیلوس کواگولانس*.

نتایج نشان می‌دهد که با افزایش درصد شربت ذرت و افزایش کنجاله سویا، pH کم شده است (نمودار a-۱۲). در صورتیکه در شمارش سلولی، با افزایش درصد شربت ذرت، تعداد سلول زنده کاهش و با افزایش درصد سویا، افزایش سلول‌های زنده مشاهده گردید (نمودار b-۱۲). شرایط بهینه در این پژوهش با مطلوبیت کل ۹۵ درصد، به میزان ۲/۴۶ درصد کنجاله سویا، ۱۰/۶۵ درصد شربت ذرت و مدت زمان h ۳۵/۳۲ به دست آمد که در این شرایط، pH و شمارش سلولی به ترتیب برابر با ۴/۵۷ و $۵/۸ \times ۱۰^{۶}$ بود.

بحث و نتیجه‌گیری

توانایی چسبندگی باکتری‌های پروبیوتیک به سلول‌های اپیتلیال روده شامل انواع مختلفی از فعل و انفعالات از جمله آبگریزی و خود تجمعی است (۳۶). چسبندگی سطحی، شاخصی از تمایل باکتری‌ها برای اتصال به حلال‌های

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

غیرقطبی است که این پتانسیل را به باکتری می‌دهد که از محیط آبی به محیط آلی و یا غیر قطبی رفته و به ذرات هیدروکربنی بر روی سلول یا سطح مخاطی بچسبد. یکی از نیازهای اصلی که باید هنگام انتخاب باکتری‌های پروبیوتیک در نظر گرفته شود، آبگریزی سطحی سویه‌های انتخابی است. آبگریزی توسط اجزای آب‌گریز موجود در غشای خارجی باکتری‌ها ایجاد شده و می‌توان از منابعی مانند زایلن، n-هگزادکان، کلروفرم و اتیل استات برای بررسی این قابلیت استفاده نمود. آبگریزی به عنوان اثر متقابل هیدروفوبیکی نیز شناخته می‌شود که نقش مهمی در چسبندگی باکتری‌ها به سلول‌های اپیتلیال دارد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد، میزان آبگریزی سویه‌های T و SH به ترتیب ۲/۶۶ و ۳۰/۷۴ درصد به دست آمد. زولخیری[28] و همکاران (۲۰۲۰)، در طی مطالعه‌ای که بر روی خواص پروبیوتیکی سویه‌های باسیلوس جدا شده از عسل زنبور بدون نیش در مالزی داشتند، دریافتند که هر دوسویه مورد بررسی، آبگریزی بالایی با زایلن از خود نشان دادند که این نشان‌دهنده چسبندگی خوب باکتریایی به هیدروکربن‌ها است (۳۷). مطالعات سریناد[29] و همکاران (۲۰۲۲) نیز نشان داد که سویه *ویزمانیا کواگولانس*[30] LMG S-31876، آبگریزی کم تا متوسط را به هیدروکربن‌ها، ۱۳/۳ درصد برای n - هگزادکان و ۱۷/۰۴ درصد برای تولوئن را نشان می‌دهد (۲۷).

خودتجمعی بر روی چسبندگی باکتری پروبیوتیک به سلول‌های روده تأثیر می‌گذارد، درحالی‌که هم‌تجمعی با باکتری‌های پاتوژن بر مکانیسم آنتاگونیستی باکتری‌های پروبیوتیک که می‌توانند مانع از اتصال سویه‌های بیماری‌زا به سلول روده شوند، مؤثر است. به همین دلیل صفات هم‌تجمعی معیارهای مهمی در جهت از بین بردن عوامل بیماری‌زا و نگهداری بهتر مواد غذایی هستند (۳۸).

ظرفیت تجمع سویه‌های SH و T با سویه‌های پاتوژن قابل توجه بود که در راستای نتایج سایر محققین بود. بطور مثال، گو و کلانامر[31] (۲۰۱۰) گزارش نمودند که پروتئین‌های سطح سلول ممکن است به تنوع در توانایی‌های تجمعی گونه کمک کرده باشد (۳۹). ادیب‌پور[32] و همکاران (۲۰۲۲)، تأثیر استرس گرمایی بر مقاومت دو گونه باسیلوس اسپورزا در مدل شبیه‌سازی دستگاه گوارش و خواص پروبیوتیکی آن‌ها بررسی کرده و نتیجه حاصل نشان‌دهنده تجمع بالاتر گونه *باسیلوس کواگولانس* با سویه‌های بیماری‌زا *اشرشیا کلی* و *سالمونلا انتریکا* نسبت به *باسیلوس سوبتیلیس* بوده، اگرچه هر دو باکتری پتانسیل تجمع بالاتری با *اشرشیا کلی* در مقایسه با سالمونلا نشان دادند (۴۰).

خاصیت چسبندگی و تجمعی وابسته به سویه است و در سویه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. اکثر مطالعات نشان می دهند که توانایی خود اتصالی وابسته به گونه بوده و تحت تأثیر شرایط محیطی است. توانایی اتصال به سطح مخاطی روده عامل مهمی برای انتخاب یک باکتری به عنوان سویه پروبیوتیک می‌باشد. این توانایی نتیجه فعل و انفعالات پیچیده فیزیکی و شیمیایی است. در خود اتصالی سلول‌های بزرگتر و سنگین‌تر سریع‌تر رسوب می‌کنند. در نتیجه می‌توان گفت که بار و اجزای سطح سلول از عواملی است که بر توانایی خود اتصالی میکروارگانیسم مؤثر است (۴۱). سویه‌هایی با پتانسیل خودتجمعی بالاتر تمایل دارند که بهتر به پوشش روده بچسبند و بنابراین می‌توانند مزایای پروبیوتیک را بهتر اعمال کنند (۴۲). این خودتجمعی برای کلونیزاسیون سطوح مختلف مهم است و نقش مهمی در بقای باکتری‌ها و مدت زمان حضور و ماندگاری طولانی‌تر میکروارگانیسم‌ها در دستگاه گوارش دارد (۴۳). کلونیزاسیون سویه‌های پروبیوتیک در روده نقش مهمی در واکنش‌های بیولوژیکی نشان می‌دهد، زیرا بر سیستم ایمنی تأثیر می‌گذارد و رقابت با پاتوژن‌ها را افزایش می‌دهد. در این مطالعه، سویه‌های *باسیلوس کواگولانس* خاصیت تجمع خودبه خودی نسبتاً خوبی را از خود نشان دادند. طبق گزارش‌های پیشین، توانایی تجمع خودبه‌خودی خوب بیش از ۴۰ درصد و هر سویه‌ای با

[28] Zulkhairi
[29] Sreenadh
[30] *Weizmannia coagulans*

[31] Goh & Klaenhammer
[32] Adibpour

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

کمتر از ۱۰ درصد دارای خود تجمعی ضعیف می‌باشد (۴۴). مشاهده می‌شود که آبگریزی سطحی سلول با ویژگی خود اتصالی مرتبط بوده، زیرا سویه‌های با چسبندگی بالاتر به هیدروکربن هگزان فعالیت خود تجمعی بالاتری را نشان دادند، که این نتایج در راستای نتایج سایر محققین می‌باشد (۲۳).

مقاومت به نمک سدیم کلرید یکی دیگر از ویژگی‌های باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد. سویه‌های مورد استفاده در این پژوهش قادر به رشد در حضور ۱-۵ درصد نمک بودند. این توانایی خاص سویه بوده و در مطالعات مشابه ممکن است نتایج متفاوت باشد. برای مثال، طی مطالعه کیم[۳۳] و همکاران (۲۰۲۱)، تحمل نمک سویه‌های *باسیلوس کواگولانس* بررسی شد تا امکان استفاده از آن‌ها در غذاهای تخمیر شده با نمک بالا ارزیابی شود. تمام سویه‌های *باسیلوس کواگولانس* در محیط کشت بدون نمک به خوبی رشد کردند، در حالی که هیچ یک از سویه‌ها در محیط حاوی ۳ درصد نمک سدیم کلرید رشد نکردند یا اسید تولید نکردند. فعالیت‌های پروتئاز و لیپاز *باسیلوس کواگولانس* خاص سویه بودند و هر دو فعالیت با افزایش غلظت نمک کاهش یا ناپدید شدند. نتایج نشان داد، *باسیلوس کواگولانس* دارای پروتئولیز، لیپولیز و فعالیت‌های تولید اسید است، بنابراین ممکن است به عنوان یک استارتر برای غذاهای تخمیر شده کم نمک مناسب باشد (۴۵). مطابق با یافته‌های این پژوهش، بانگ[۳۴] و همکاران (۲۰۲۱) و سریناد و همکاران (۲۰۲۲)، طی مطالعاتی که بر روی سویه‌های مختلف *باسیلوس کواگولانس* داشتند، گزارش کردند که با وجود رشد قابل توجه باکتری در ۵ درصد نمک سدیم کلرید، زنده‌مانی آن‌ها با افزایش بیشتر غلظت نمک کاهش می‌یابد (۲۷, ۴۶).

ویژگی اساسی پروبیوتیک‌ها این است که بتوانند در طول گذر از لوله گوارش، زنده مانده و به روده کوچک برسند و در آنجا تشکیل کلنی داده و فواید سلامتی مثبت خود را برای میزبان به عمل آورند (۴۷). به عنوان مثال، یکی از معیارهای اصلی در گزینش یک باکتری پروبیوتیک، قدرت تحمل و زنده‌مانی در pH پایین قسمت فوقانی دستگاه گوارش است. معمولاً pH های زیر ۲/۵ اثر کشندگی بر باکتری‌ها دارد و این امر می‌تواند در نابودی پاتوژن‌ها نیز حائز اهمیت باشد؛ هرچند امکان از بین رفتن باکتری پروبیوتیک نیز در آن شرایط وجود دارد. بطور کلی، سویه SH در pH=3 و سویه T در pH=2 مقاومت بالاتری نسبت به سویه دیگر نشان دادند. نتایج به‌دست آمده با نتایج مطالعات آدامی و کاوازونی[۳۵] (۱۹۹۳) که بر روی *باسیلوس کواگولانس* داشتند، مطابقت داشت (۴۸). سوئی[۳۶] و همکاران (۲۰۲۰) نیز گزارش کردند که سویه *باسیلوس کواگولانس* T242 تحمل خوبی به شرایط شبیه سازی شده معده نشان دادند و جمعیت آن تنها ۱۰ درصد در pH = ۳ کاهش یافت (۴۹). در حالیکه بررسی‌های هایرونیموس[۳۷] و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که سویه‌های *باسیلوس کواگولانس* حساس به شرایط اسیدی می‌باشند (۶). از این رو وجود یک ناهمگونی مشابه در پاسخ به محیط‌های اسیدی در گونه *باسیلوس کواگولانس* دیده می‌شود. گلو و همکاران (۲۰۱۷) مقادیر بالای تولید آنزیم‌ها و اسیدهای آمینه و یکپارچگی غشای سلولی را به عنوان عوامل مؤثر برای جلوگیری از مرگ باکتری‌ها از تنش اسیدی اعلام کردند (۵۰).

سایر موانع برای باکتری‌های پروبیوتیک، شیره‌های دستگاه گوارش مانند پپسین و تریپسین هستند. داده‌ها نشان می‌دهند که جوامع خاص گونه‌ها در روده انسان نسبتاً در برابر اختلالات مقاوم به نظر می‌رسند؛ به این دلیل که معده اسیدی انسان از کلونیزاسیون مکرر روده توسط تعداد زیادی از میکروب‌های منتقله از غذا صرف نظر از مفید یا بیماری‌زا بودن آن‌ها جلوگیری می‌کند (۵۱). بطور کلی، سویه T در مقایسه با SH مقاومت بیشتری نسبت به آنزیم‌های پروتئولیتیک طی زمان از خود نشان داد. نتایج حاصل از آزمایشات شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش با نتایج ماتیوس[۳۸]

[33] Kim
[34] Bang
[35] Adami & Cavazzoni
[36] Sui
[37] Hyronimus
[38] Maathuis

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد (۵۲). این محققین در یک مدل پویا، معتبر و آزمایشگاهی معده و روده کوچک بر روی *باسیلوس کواگولانس* Ganeden BC30 دریافتند که این سویه ۷۰ درصد زنده ماند اگرچه جوانه‌زنی اسپورها تحت شرایط آزمایش شده حداقل (۱۰ درصد) بود. طی بررسی‌های انجام شده توسط آهیره[39] و همکاران (۲۰۲۰)، بر روی بقا و جوانه‌زنی اسپورهای *باسیلوس کلاسی*[40] UBBC07 در مدل شبیه‌سازی دستگاه گوارش انسان در شرایط آزمایشگاهی و ارزیابی تولید کلائوزین، مشاهده شد که پروبیوتیک اسپورزا قادر به زنده ماندن و جوانه زدن در شرایط آزمایشگاهی فوقانی دستگاه گوارش بوده و تولید کلائوزین که در برابر پروتئازها (پپسین، پروتئیناز K و تریپسین) پایدار بوده، کاربرد سویه در درمان اسهال را توجیه می‌کند (۵۳).

مطابق با مستندات نورگا[41] و همکاران (۲۰۰۴)، غلظت نمک صفراوی در روده کوچک حدود ۰/۳ درصد پس از ساعت اول هضم است (۵۴). سویه‌های مورد مطالعه در این پژوهش نسبت به نمک صفراوی تحمل خوبی نشان دادند که با یافته‌های هایرونیموس و همکاران (۲۰۰۰) مطابقت دارد (۶). همچنین طبق نتایج سوئی و همکاران (۲۰۲۰)، *باسیلوس کواگولانس* T242 توانست در حضور ۰/۳ درصد نمک صفراوی گاو زنده بماند (۴۹). سریناد و همکاران (۲۰۲۲) نیز طی ارزیابی خواص *ویزمانیا کواگولانس* LMG S-31876 جداشده از برنج تخمیرشده، تحمل ۰/۳ درصد صفرا توسط این سویه را در مدت ۴ h گرمخانه گذاری تأیید کرد (۲۷). یافته‌های هائو[42] و همکاران (۲۰۰۱) و ریپامونتی[43] و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان می‌دهد که اسپورهای *باسیلوس کواگولانس* به صفرا و شرایط اسیدی دستگاه گوارش پایدار بوده و توانایی زنده ماندن در دستگاه گوارش میزبان را دارند (۵۵, ۵۶).

مقاومت حرارتی باکتری‌های پروبیوتیک از منظر کارهای صنعتی بسیار حائز اهمیت است. در مقایسه بین سویه‌ها، زنده‌مانی سویه SH نسبت به سویه T، کاهش کمتری را نشان داد. دمای بهینه رشد *باسیلوس کواگولانس* بین °C ۵۰-۳۵ است ولی به دلیل وجود اسپور می‌تواند در دماهای بالا و حرارت‌های بیشتر نیز از خود مقاومت نشان دهد. حال با مشاهده نتایج به‌دست آمده، می‌توان نتیجه گرفت که دمای بالاتر از °C ۵۰ تأثیر منفی بر روی رشد سلولی دارد. ادیبپور و همکاران (۲۰۲۲)، جهت تأثیر استرس گرمایی بر مقاومت دو گونه *باسیلوس کواگولانس* و *باسیلوس سوبتیلیس* در آب‌نبات‌های پروبیوتیک پوشش داده شده، پس از تحمل تنش گرمایی آب در حال جوش و محیط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش، مورد بررسی قرار داده و نتیجه حاصل نشان داد که سویه‌ها به ترتیب بیش از ۸۵ و ۸۲ درصد زنده ماندند (۴۰).

اسپور باکتری‌ها مقاومت مشخصی را به انواع شرایط سخت مثل سرما، گرما و نیروی مکانیکی دارد. دلیل آن وجود ساختار و پوشش‌های پروتئینی است که می‌تواند اسید معده و نمک‌های صفراوی را در مسیر روده کوچک و بزرگ تحمل کنند (۵۷). هر دو سویه مورد بررسی در این مطالعه قابلیت تولید اسپور را داشتند. کاهش آشکار تعداد اسپورها از طریق عبور دستگاه گوارش موش صحرایی در حالی که بر میکروبیوتای دستگاه گوارش تأثیر می‌گذارد، از این واقعیت پشتیبانی می‌کند که گونه‌های باسیلوس می‌توانند یک رابطه درون همزیستی با میزبان داشته و به طور موقت زنده بمانند و در دستگاه گوارش تکثیر شوند (۵۸). در طی گزارش گنجوری و همکاران (۱۳۹۱)، پایداری و مقاومت اسپور *باسیلوس کواگولانس*، به عنوان گزینه‌های مناسب به منظور استفاده در محصولات غیر لبنی و pH پایین، به ویژه موادی مانند ژله که دارای فراوری حرارتی در حین تولید می‌باشند، قرار می‌دهد (۵۹).

تخمیر علاوه بر ایجاد تغییرات کیفی، فیزیکی، شیمیایی و حسی به حفظ مواد غذایی به دلیل انتشار متابولیت‌هایی که مانع رشد باکتری‌های بیماری‌زا در غذاها می‌شود، کمک می

[39] Ahire
[40] *Bacillus clausii*
[41] Noriega
[42] Hoa
[43] Ripamonti

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

کند. تخمیر، طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتری‌های اسید استیک، مخمرها، کپک‌ها و باکتری‌ها و همچنین طیف گسترده‌ای از محصولات به عنوان مواد اصلی، مکمل‌های اصلی، چاشنی‌ها و نوشیدنی‌ها، از بسترهایی مانند غلات، حبوبات، سویا، گل-ها، شیر و گوشت را پوشش می‌دهد (۶۰).

یک باکتری دارای پتانسیل تکنولوژیکی، بایستی در یک محیط کشت مغذی با دما و زمان مناسب رشد، pH تیمار را با ترشح اسید کاهش دهد. pH اولیه محیط یک فاکتور حیاتی برای رشد میکروبی و نرخ بالای ترشح اسید لاکتیک است. دمای پایین مانند ۳۷ °C و ۴۵ °C و pH= ۷ برای رشد سلول و تولید اسید لاکتیک از نظر زمان تخمیر کوتاه مطلوب است. از سوی دیگر، دمای بالا مانند ۵۵ °C و ۶۰ °C رشد سلول را محدود کرده و پس از آن بر تولید اسید لاکتیک تأثیر می-گذارد (۶۱). نتایج این مطالعه نشان داد که در بین سویه‌ها و منابع کربنی، سویه SH و شربت ذرت مناسب‌ترین شرایط برای کاهش pH و افزایش شمارش سلولی می‌باشند. شربت ذرت یک شیرین کننده مایع جایگزین ساکارز است که در بسیاری از غذاها و نوشیدنی ها استفاده می شود. این منبع کربنی در غذاها و نوشیدنی‌های اسیدی پایدار بوده و به عنوان یک عنصر مشتق شده از ذرت - یک ماده خام کشاورزی تجدید پذیر و مقرون به صرفه می‌باشد (۶۲). در تحقیقات مشابه، طی مطالعه‌ای که کاظم علی‌لو[44] و همکاران (۲۰۲۱)، بر خواص شیر پروبیوتیک طعم‌دار با *باسیلوس کواگولانس* و شربت انگور داشتند، مشاهده شد که غلظت‌های مختلف شیره انگور و مدت زمان نگهداری بر pH اثر معناداری دارد (۶۳). به‌طوری که با افزایش غلظت شیره انگور و مدت زمان نگهداری، pH محصول کاهش یافت. به این دلیل که طی مدت زمان نگهداری، تولید اسید لاکتیک توسط باکتری افزایش یافت و با افزایش غلظت شیره انگور، ماده غذایی مورد نیاز جهت فعالیت باکتری تأمین گردید و شیره انگور محیط بهتری برای رشد باکتری‌های پروبیوتیک بود. محققین ذکر نمودند که شیره انگور حامل فاکتورهای رشد می‌باشد که در شیر وجود ندارد. همچنین با افزایش تولید اسیدلاکتیک، اسیدیته محصول نیز افزایش یافت. افزایش اسیدیته پارامتری است که نشان‌دهنده عملکرد تخمیر یک کشت میکروبی است. گزارش امیری[45] و همکاران (۲۰۱۹)، نیز مبنی بر تأثیر معنی‌داری دما و مدت زمان گرمخانه‌گذاری، غلظت عصاره مخمر، نوع محیط کشت و نوع باکتری پروبیوتیک بر اسیدیته قابل تیتراسیون، مهر تاییدی بر این نتایج بود. در این مطالعه، با افزایش غلظت شیره انگور و کاهش pH، به مرور زنده‌مانی *باسیلوس کواگولانس* شیر طعم‌دار کاهش یافت (۶۴).

آنزیم‌های پروتئولیتیک کاربردهای زیادی در علم و فناوری مواد غذایی دارند و محصول آن‌ها منبع غنی از پپتیدهای فعال بیولوژیکی است که توالی آن‌ها در داخل پروتئین پیش‌ساز غیر فعال هستند. آن‌ها از طریق عمل آنزیم‌های پروتئولیتیک از منشأهای مختلف مانند میکروارگانیسم‌ها، سیستم گوارش و غیره آزاد می‌شوند (۶۵). *باسیلوس کواگولانس* منبع خوبی برای آنزیم‌های پروتئولیتیک و فیبرینولیتیک برای کاربردهای غذایی و دارویی است و تولیدکننده بالقوه پروتئاز است (۶۶). مطالعات قبلی این واقعیت را ثابت کرده‌اند که سویه‌های باسیلوس، اگزوآنزیم‌های زیادی ترشح می‌کنند که در تجزیه مواد مولکولی بزرگ به واحدهای کوچک‌تر بسیار کارآمد هستند (۶۷). سویه‌های باسیلوس غالب‌ترین عوامل تخمیرکننده طبیعی در سویا به شمار می‌روند. این باکتری‌های هیدرولیتیک با استفاده و کاهش الیگوساکاریدها و پلی‌ساکاریدهای غیرقابل هضم مرتبط هستند. این ارگانیسم همچنین نشان داده است که فعالیت ضد مغذی را کاهش می-دهد که مانع دسترسی پروتئین‌ها و فیتوکمیکال‌های موجود در سویا می‌شود (۶۸, ۶۹). ماهیت موجودات تخمیری و ترجیح سوبسترا، تکامل pH در تخمیر باسیلوس را تعیین می-کنند (۷۰). پروتئین سویا تعادل خوبی بین اسیدهای آمینه و کیفیت قابل مقایسه با پروتئین های حیوانی مانند گوشت گاو و شیر دارد. علاوه بر این، سطح لیزین بالای آن باعث می شود مکمل مناسبی برای پروتئین های مبتنی بر غلات با

[44] Kazem Alilou

45 Amiri

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

محتوای لیزین پایین باشد (۷۱).گزارش شده است که هیدرولیز پروتئین برای تولید آمین‌ها و آمونیاک از طریق پپتیدها و اسیدهای آمینه مسئول تغییر اولیه pH است (۷۲). افزایش اسیدیته قابل تیتراسیون از ۰/۰۲ به ۰/۰۹درصد (به عنوان اسید لاکتیک) در طول دوره تخمیر وجود دارد (۷۰). سرکار و تمانگ۴۶ (۱۹۹۵) گزارش دادند که پروتئاز *باسیلوس سوبتیلیس* پروتئین سویا را تجزیه می‌کند و منجر به افزایش قابل‌توجهی در نیتروژن غیر پروتئینی و محلول می‌شود (۷۳). اعتقاد بر این است که افزایش محتوای پروتئین با افزایش سنتز میکروبی پروتئین یا آنزیم‌ها یا بازآرایی ترکیبات و به دنبال آن تخریب ترکیبات دیگر همراه است (۷۴). سویا دارای تمام اسیدآمینه‌های ضروری است. تخمیر سویا، به ویژه با *باسیلوس سوبتیلیس*، منجر به هیدرولیز گسترده تمام ماکرومولکول‌ها مانند پروتئین‌ها به پپتیدهای کوچکتر، اسیدهای آمینه و ترکیبات گوگرد و نیتروژن ساده می‌شود (۷۵).

طبق نتایج حاصل از تحقیقات هافریس و کاستیلو۴۷ (۱۹۵۷) بر روی نیازهای تغذیه‌ای *باسیلوس کواگولانس*، گزارش شد که اسید گلوتامیک ممکن است نقش مهمی در تغذیه این سویه چه به عنوان یک متابولیت ضروری و چه به عنوان یک مکمل رشد داشته باشد (۷۶). از آن‌جاییکه کنجاله سویا منبع غنی از گلوتامیک اسید است (۷۱)، بنابراین یک محیط رشد مغذی برای *باسیلوس کواگولانس* می‌تواند محسوب شود. طی مطالعاتی که گانگ[۴۸] و همکاران (۲۰۱۵)، بر روی خصوصیات بیوشیمیایی یک تریپسین قلیایی خاص آرژنین از *باسیلوس لیکنی‌فرمیس* داشتند، بهینه‌سازی شرایط کشت به روش «یک متغیر در یک زمان» انجام شد (۷۱). دمای پایین، شرایط pH اسیدی و قلیایی به شدت فعالیت تریپسین را کاهش داد. میزان تلقیح تأثیر کمی بر فعالیت آنزیم داشت و زمانیکه آرد ذرت و پپتون سویا به عنوان منابع کربن و نیتروژن استفاده شدند، غلظت بالای منبع کربن یا نیتروژن رشد سلول را تحریک کرد، اما فعالیت آنزیم را کاهش داد در حالی که نتیجه معکوس با غلظت‌های پایین مشاهده شد. ماتیوس و همکاران (۲۰۰۹)، طی مطالعاتی که بر روی بقا و فعالیت متابولیک یک سویه *باسیلوس کواگولانس* در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده انجام دادند، گزارش کردند که بقای سویه در حضور لاکتوز و فروکتوز به طور قابل‌توجهی کمتر از عدم وجود قند بود (۵۲). این ممکن است به این معنی باشد که هاگ‌های بیشتری در حضور این قندها جوانه می‌زنند و از آنجایی که سلول‌های جوانه زده به شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش حساس‌تر هستند، بقا کمتر بوده است.

بطور کلی، در سال‌های اخیر اقدامات زیادی در جهت بهبود مدیریت پسماند با هدف کاهش اثرات منفی زیست محیطی و تقویت اقتصاد زیستی انجام شده است. همچنین با توجه به اهمیت و کاربرد تخمیر و تولیدات تخمیری در جهان، می‌توان با به‌کارگیری بیوتکنولوژیکی و استفاده از این پسماندها و بستره‌های صنعتی ارزان قیمت در جهت تولید فرآورده‌های مهم و با ارزشی همچون اسیدلاکتیک و آنزیم اقدام نمود. در این راستا، *باسیلوس کواگولانس* با دارا بودن خواص پروبیوتیکی و تکنولوژیکی خوب، این امکان را می‌سازد که در فرآیند تولید با بستره‌های ارزان قیمت کربنی و نیتروژنی و در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، دارویی و دامپروری از آن بهره‌برداری گردد.

[46] Sarkar & Tamang
[47] Humphreys & Costilow
[48] Gong

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

منابع

1. Lebeer S, Bron PA, Marco ML, Van Pijkeren J-P, Motherway MOC, Hill C, et al. Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. Current opinion in biotechnology. 2018;49:217-23.
2. Özüsağlam MA. Importance of Bacillus coagulans bacterium as probiotic in animal nutrition. Süleyman Demirel University Journal of Agriculture (Turkey). 2010.
3. Kim J, Muhammad N, Jhun BH, Yoo JW.. Probiotic delivery systems: A brief overview. Journal of pharmaceutical investigation. 2016; 46, 377-386.
4. Casula G, Cutting SM. Bacillus probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. Applied and environmental microbiology. 2002;68(5):2344-52.
5. Majeed M, Natarajan S, Sivakumar A, Ali F, Pande A, Majeed S, Karri SK. Evaluation of anti-diarrhoeal activity of Bacillus coagulans MTCC 5856 and its effect on gastrointestinal motility in Wistar rats. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2016;7(1):P311â.
6. Hyronimus B, Le Marrec C, Sassi AH, Deschamps A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. International journal of food microbiology. 2000;61(2-3):193-7.
7. Bora PS, Puri V, Bansal AK. Physicochemical properties and excipient compatibility studies of probiotic Bacillus coagulans spores. Scientia Pharmaceutica. 2009;77(3):625-38.
8. van der Pol EC, Eggink G, Weusthuis RA. Production of l (+)-lactic acid from acid pretreated sugarcane bagasse using Bacillus coagulans DSM2314 in a simultaneous saccharification and fermentation strategy. Biotechnology for biofuels. 2016;9:1-12.
9. Ou MS, Awasthi D, Nieves I, Wang L, Erickson J, Vermerris W, et al. Sweet sorghum juice and bagasse as feedstocks for the production of optically pure lactic acid by native and engineered Bacillus coagulans strains. BioEnergy Research. 2016;9:123-31.
10. Neu A-K, Pleissner D, Mehlmann K, Schneider R, Puerta-Quintero GI, Venus J. Fermentative utilization of coffee mucilage using Bacillus coagulans and investigation of down-stream processing of fermentation broth for optically pure l (+)-lactic acid production. Bioresource technology. 2016;211:398-405.
11. Zhang Y, Chen X, Luo J, Qi B, Wan Y. An efficient process for lactic acid production from wheat straw by a newly isolated Bacillus coagulans strain IPE22. Bioresource technology. 2014;158:396-9.
12. Aulitto M, Fusco S, Bartolucci S, Franzén CJ, Contursi P. Bacillus coagulans MA-13: a promising thermophilic and cellulolytic strain for the production of lactic acid from lignocellulosic hydrolysate. Biotechnology for biofuels. 2017; 10, 1-15.
13. Wu T, Zhang Y, Lv Y, Li P, Yi D, Wang L, et al. Beneficial impact and molecular mechanism of Bacillus coagulans on piglets' intestine. International Journal of Molecular Sciences. 2018;19(7):2084.
14. Satari B, Karimi K. Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. Resources, Conservation and Recycling. 2018;129:153-67.
15. De Groof V, Coma M, Arnot T, Leak DJ, Lanham AB. Medium chain carboxylic acids from complex organic feedstocks by mixed culture fermentation. Molecules. 2019;24(3):398.
16. Azam MT, Ahmad A.. Date palm waste: an efficient source for production of glucose and lactic acid. Sustainable Agriculture Reviews 34: Date Palm for Food, Medicine and the Environment, (2019); 155-178.
17. Vásquez ZS, de Carvalho Neto DP, Pereira GVM, Vandenberghe LPS, de Oliveira PZ, Tiburcio PB, et al. Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. Waste management. 2019;90:72-83.
18. Alexandri M, Neu AK, Schneider R ,López-Gómez JP, Venus J. Evaluation of various Bacillus coagulans isolates for the production of high purity L-lactic acid using defatted rice bran hydrolysates. International journal of food science & technology. 2019;54(4):1321-9.
19. Cole MR, Eggleston G, Gaines DK, Heckemeyer M. Development of an enzyme cocktail to bioconvert untapped starch in sweet sorghum processing by-products: Part I. Industrial crops and products. 2019;133:142-50.
20. Jiang K, Tang B, Wang Q, Xu Z, Sun L, Ma J, et al. The bio-processing of soybean dregs by solid state fermentation using a poly γ-glutamic acid producing strain and its effect as feed additive. Bioresource technology. 2019;291:121841.
21. Mukherjee R, Chakraborty R, Dutta A. Comparison of optimization approaches (response surface methodology and artificial neural network-genetic algorithm) for a novel mixed culture approach in soybean meal fermentation. Journal of food process engineering. 2019;42(5):e13124.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

22. Jose NM, Bunt CR, Hussain MA. Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. Microorganisms. 2015;3(2):198-212.
23. Zareie Z, Moayedi A, Garavand F, Tabar-Heydar K, Khomeiri M, Maghsoudlou Y. Probiotic properties, safety assessment, and aroma-generating attributes of some lactic acid bacteria isolated from Iranian traditional cheese. Fermentation. 2023;9(4):338.
24. Armas F, Camperio C, Marianelli C. In vitro assessment of the probiotic potential of Lactococcus lactis LMG 7930 against ruminant mastitis-causing pathogens. PLoS One. 2017;12(1):e0169543.
25. Polak-Berecka M, Waśko A, Paduch R, Skrzypek T, Sroka-Bartnicka A. The effect of cell surface components on adhesion ability of Lactobacillus rhamnosus. Antonie Van Leeuwenhoek. 2014;106:751-62.
26. Zareie Z, Moayedi A, Khomeiri M, Maghsoudlou Y, Garavand F, Tabar-Heidar K. Investigation of safety, probiotic properties and ability of aromatic compounds production of proteolytic lactic acid bacteria isolated from raw milk.
27. Sreenadh M, Kumar KR, Nath S. In vitro evaluation of Weizmannia coagulans strain LMG S-31876 isolated from fermented rice for potential probiotic properties, safety assessment and technological properties. Life. 2022;12(9):1388.
28. Chung HS, Kim YB, Chun SL, Ji GE. Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. International journal of food microbiology. 1999;47(1-2):25-32.
29. Chu-Ky S, Bui TK, Nguyen TL, Ho PH. Acid adaptation to improve viability and X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase activity of the probiotic bacterium Lactobacillus fermentum HA 6 exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. International Journal of Food Science & Technology. 2014;49(2):565-70.
30. Guo Z, Wang J, Yan L, Chen W, Liu X-m, Zhang H-p. In vitro comparison of probiotic properties of Lactobacillus casei Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. LWT-Food Science and Technology. 2009;42(10):1640-6.
31. Palop A, Raso J, Condón S, Sala FJ. Heat resistance of Bacillus subtilis and Bacillus coagulans: effect of sporulation temperature in foods with various acidulants. Journal of food protection. 1996;59(5):487-92.
32. Olajuyigbe FM, Ehiosun KI. Production of thermostable and organic solvent-tolerant alkaline protease from Bacillus coagulans PSB-07 under different submerged fermentation conditions. African journal of biotechnology. 2013;12.(21)
33. Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, Catignani GL. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. Journal of dairy science. 1983;66(6):1219-27.
34. Donkor ON, Nilmini SLI, Stolic P, Vasiljevic T, Shah NP. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. International dairy journal. 2007;17(6):657-65.
35. Senyk GF, Scheib JA, Brown JM, Ledford RA. Evaluation of methods for determination of spore-formers responsible for the late gas-blowing defect in cheese. Journal of Dairy Science. 1989;72(2):360-6.
36. Botes M, Loos B, van Reenen CA, Dicks LMT. Adhesion of the probiotic strains Enterococcus mundtii ST4SA and Lactobacillus plantarum 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. Archives of microbiology. 2008;190:573-84.
37. Zulkhairi Amin FA, Sabri S, Ismail M, Chan KW, Ismail N, Mohd Esa N, et al. Probiotic properties of Bacillus strains isolated from stingless bee (Heterotrigona itama) honey collected across Malaysia. International journal of environmental research and public health. 2020;17(1):278.
38. Xu H, Jeong HS, Lee HY, Ahn J. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. Letters in applied microbiology. 2009; 49(4), 434-442.
39. Goh YJ, Klaenhammer TR. Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of Lactobacillus acidophilus NCFM. Applied and environmental microbiology. 2010;76(15):5005-12.
40. Adibpour N, Hosseininezhad M, Pahlevanloo A. Effect of Heat Stress on the Resistance of two Spore Forming Bacillus Species in the Gastrointestinal Tract Simulation Model and their Probiotic Properties. Research and Innovation in Food Science and Technology. 2022;11(1):29-42.
41. Han Q, Kong B, Chen Q, Sun F, Zhang H. In vitro comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. Journal of Functional Foods. 2017;32:391-400.
42. Perez MK, Paulson HL, Pendse SJ, Saionz SJ, Bonini NM, Pittman RN. Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. The Journal of cell biology. 1998;143(6):1457-70.
43. Rajab S, Tabandeh F, Shahraky MK, Alahyaribeik S. The effect of lactobacillus cell

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

size on its probiotic characteristics. Anaerobe. 2020;62:102103.
44. Wang Y, Zhang H, Zhang L, Liu W, Zhang Y, Zhang X, Sun T. In vitro assessment of probiotic properties of Bacillus isolated from naturally fermented congee from Inner Mongolia of China. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2010;26:1369-77.
45. Kim Y-S, Lee J, Heo S, Lee J-H, Jeong D-W. Technology and safety evaluation of Bacillus coagulans exhibiting antimicrobial activity for starter development. LWT. 2021;137:110464.
46. Bang WY ,Ban OH, Lee BS, Oh S, Park C, Park M-K, et al. Genomic-, phenotypic-, and toxicity-based safety assessment and probiotic potency of Bacillus coagulans IDCC 1201 isolated from green malt. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2021;485-) :(6kuab026.
47. Yasmin I, Saeed M, Khan WA, Khaliq A, Chughtai MFJ, Iqbal R, et al. In vitro probiotic potential and safety evaluation (hemolytic, cytotoxic activity) of Bifidobacterium strains isolated from raw camel milk. Microorganisms. 2020;8(3):354.
48. Adami A, Cavazzoni V. Biomass production, preservation and characteristics of a strain of Bacillus coagulans usable as probiotic. 1993.
49. Sui L, Zhu X, Wu D, Ma T, Tuo Y, Jiang S, et al. In vitro assessment of probiotic and functional properties of Bacillus coagulans T242. Food Bioscience. 2020;36:100675.
50. Guo Y, Tian X, Huang R, Tao X, Shah NP, Wei H, Wan C. A physiological comparative study of acid tolerance of Lactobacillus plantarum ZDY 2013 and L. plantarum ATCC 8014 at membrane and cytoplasm levels. Annals of Microbiology. 2017;67:669-77.
51. McCord AI, Chapman CA, Weny G, Tumukunde A, Hyeroba D, Klotz K, et al. Fecal microbiomes of non-human primates in Western Uganda reveal species-specific communities largely resistant to habitat perturbation. American journal of primatology. 2014;76(4):347-54.
52. Maathuis AJH, Keller D, Farmer S. Survival and metabolic activity of the GanedenBC30 strain of Bacillus coagulans in a dynamic in vitro model of the stomach and small intestine. Beneficial microbes. 2009;1(1):31-6.
53. Ahire JJ, Kashikar MS, Madempudi RS. Survival and germination of Bacillus clausii UBBC07 spores in in vitro human gastrointestinal tract simulation model and evaluation of clausin production. Frontiers in Microbiology. 2020;11:101.0
54. Noriega L, Gueimonde M, Sánchez B, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in Bifidobacterium. International journal of food microbiology. 2004;94(1):79-86.
55. Hoa TT, Duc LH, Isticato R, Baccigalupi L, Ricca E, Van PH, Cutting SM. Fate and dissemination of Bacillus subtilis spores in a murine model. Applied and environmental microbiology. 2001;67(9):3819-23.
56. Ripamonti B, Agazzi A, Baldi A, Balzaretti C, Bersani C, Pirani S, et al. Administration of Bacillus coagulans in calves: recovery from faecal samples and evaluation of functional aspects of spores. Veterinary Research Communications. 2009;33:991-1001.
57. Ara K, Meguro S, Hase T, Tokimitsu I, Otsuji K, Kawai S, et al. Effect of spore-bearing lactic acid-forming bacteria (Bacillus coagulans SANK 70258) administration on the intestinal environment, defecation frequency, fecal characteristics and dermal characteristics in humans and rats. Microbial Ecology in Health and Disease. 2002;14(1):4-13.
58. Hong HA, Duc LH, Cutting SM. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS microbiology reviews. 2005;29(4):813-35.
59. Ganjoori M, Mehrabian S, Akhavansepahi A. Enrichment breads,using of potential probiotic bacillus(Bacillus coagolans). Modares Journal of Biotechnology. 2012;3(1):37-46.
60. Tamang JP, Sarkar PK, Hesseltine CW. Traditional fermented foods and beverages of Darjeeling and Sikkim–a review .Journal of the Science of Food and Agriculture. 1988;44(4):375-85.
61. Ma K, Maeda T, You H, Shirai Y. Open fermentative production of l-lactic acid with high optical purity by thermophilic Bacillus coagulans using excess sludge as nutrient. Bioresource Technology. 2014;151:28-35.
62. White J S. Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't. The American journal of clinical nutrition. 2008; 88(6), 1716S-1721S.
63. Kazem Alilou N, Amiri S, Rezazadeh Bari M, Dodangeh S. Investigation of chemical and microbial properties of flavored probiotic milk using Bacillus coagulans and grape syrup. Journal of food science and technology (Iran). 2021; 18(112), 11-19.
64. Amiri S, Sowti Khiabani M, Rezazadeh Bari M, Alizadeh M. Development of the antioxidant activity in cheese whey and milk permeate using Lactobacillus acidophilus LA5 and Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB12. Journal of food science and technology (Iran). 2019;16(91):65-79.
65. Korhonen H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. Journal of functional foods. 2009;1(2):177-87.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

66. Fitzpatrick LR, Small JS, Greene WH, Karpa KD, Keller D. Bacillus coagulans GBI-30 (BC30) improves indices of Clostridium difficile-induced colitis in mice. Gut pathogens. 2011;3:1-9.
67. Ninawe AS, Selvin J. Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges. Critical reviews in microbiology. 2009;35(1):43-66.
68. Esteves EA, Martino HSD, Oliveira FCE, Bressan J, Costa NMB. Chemical composition of a soybean cultivar lacking lipoxygenases (LOX2 and LOX3). Food chemistry. 2010;122(1):238-42.
69. Sarkar PK, Jones LJ, Craven GS, Somerset SM. Oligosaccharide profiles of soybeans during kinema production. Letters in applied microbiology. 1997;24(5):337-9.
70. Sarkar PK, Cook PE, Owens JD. Bacillus fermentation of soybeans. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1993;9:295-9.
71. Zareie Z, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SAOptimization of gamma-aminobutyric acid production in a model system containing soy protein and inulin by Lactobacillus brevis fermentation. Journal of Food Measurement and Characterization. 2019; 13, 2626-2636.
72. Odunfa SA. Biochemical changes in fermenting African locust bean (Parkia biglobosa) during ‘iru’fermentation. International Journal of Food Science & Technology. 1985;20(3):295-303.
73. Sarkar PK, Tamang JP. Changes in the microbial profile and proximate composition during natural and controlled fermentations of soybeans to produce kinema. Food Microbiology. 1995;12:317-25.
74. Hu Y, Ge C, Yuan W, Zhu R, Zhang W, Du L, Xue J. Characterization of fermented black soybean natto inoculated with Bacillus natto during fermentation. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2010;90(7):1194-202.
75. Ang CYW, Liu K, Huang Y-W. Asian foods: Science and technology: CRC Press; 1999.
76. Humphreys TW, Costilow RN. Observations on the nutritional requirements of Bacillus coagulans. Canadian Journal of Microbiology. 1957;3(4):533-41.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]

Assessment of Probiotic and Technological Capabilities of *Bacillus coagulans* and its Performance in Utilization of Various Carbon and Nitrogen Sources

Fatemeh Khademi[1], **Ali Moayedi [1*]**, Zahra Zareie[1], Morteza Khomeiri[1], Behrouz Dastar[2]

[1] Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[2] Department of Animal and Poultry Nutrition, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

Some strains of *Bacillus coagulans* have shown probiotic characteristics as well as numerous technological features that make it useful across multiple industries. In this research, some of these characteristics were evaluated in strains IBRC10807 (T strain) and GBI-30, 6086, and their performance in the use of different carbon and nitrogen sources and the comparison of the intensity of proteolysis of nitrogen sources were investigated. The results showed that the surface hydrophobicity was higher for the SH strain and the accumulation of *Staphylococcus aureus* with this strain was higher than with the T strain. The strains showed relatively good spontaneous aggregation properties and were able to grow in the presence of salt and resistant to gastric acid conditions. In addition, the results indicated that both strains were capable of proteolysis, with the SH strain demonstrating higher efficiency than the T strain when using corn syrup as the carbon source and soybean meal as the nitrogen source. Optimal conditions for fermentation were determined in this study, resulting in a total desirability of 95%, with the optimal amounts of soybean meal at 2.46%, corn syrup at 10.65%, and a fermentation time of 32.35 h. These findings suggest that *B. coagulans* strains have both probiotic and technological properties and can effectively ferment inexpensive carbon and nitrogen substrates to produce valuable materials.

Keywords: Optimization, Fermentation, Proteolytic activity

[*] amoayedi@gau.ac.ir

[Downloaded from amfi.ir on 2025-08-02]