

ارزیابی اثر آنتاگونیستی لاکتوباسیل‌های جدا شده از مواد غذایی بومی ایران

میترا صالحی*

استاد یار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۹/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۱۱

چکیده

فرآورده‌های لبنی حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشند آماده سازی غذاهای سنتی با مواد لبنی دارای قدمت طولانی است. این مطالعه با هدف ارزیابی اثر آنتاگونیستی لاکتوباسیل‌های جدا شده از برخی مواد غذایی محلی که از دیر باز به صورت سنتی در استان‌های غربی و شرقی ایران تهیه می‌شوند، انجام گردید. در این تحقیق بعد از شمارش تعداد لاکتوباسیل‌ها در نمونه‌های مواد غذایی سنتی، اثر ضد میکروبی ایزوله‌ها بر علیه دو باکتری استافیلوکوک اورئوس و اشریشیا کلی از طریق انتشار در آگار، ابتدا به روش کشت نقطه‌ای و سپس به روش دیسک گذاری با استفاده از محلول رویی تهیه شده از کشت لاکتوباسیل‌ها، مورد بررسی قرار گرفت. ۷۰ درصد از ایزوله‌های مورد ارزیابی، دارای توانایی مهار رشد علیه باکتری‌های اندیکاتور بودند. سویه‌های لاکتوباسیلوس کازه ای و پلانتروم در روش دیسک گذاری قادر به ایجاد بیشترین قطر هاله‌های عدم رشد بر علیه باکتری‌های نشانگر بودند. فعالیت ضد باکتریایی مشاهده شده توسط لاکتوباسیل‌ها، به دلیل تولید باکتریوسینمی باشد. با توجه به منشاء جداسازی لاکتوباسیل‌ها، خالص سازی باکتریوسین‌های این سویه‌ها می‌تواند به عنوان فرآورده‌های پروبیوتیکی به منظور افزودن به مواد غذایی و نگهدارنده بیولوژیک مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس، پروبیوتیک، غذاهای سنتی.

۱- مقدمه

از قرن‌ها پیش، مصرف میکروارگانیسم‌های زنده (پروبیوتیک‌ها) در مواد غذایی به منظور سلامت انسان، در کشورهای مختلف جهان رایج بوده است (۱۷). در سال‌های اخیر، توجه محققان به شناسایی مواد غذایی حاوی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی مانند لاکتوباسیل‌ها جلب شده است (۱۸).

لاکتوباسیل‌ها عبارتند از باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت، میکروآتروفیلیک که در مواد گیاهی و جانوری مانند: شیر، دوغ، پنیر و ماست یافت می‌شوند و یکی از عمده‌ترین باکتری‌ها با توان پروبیوتیکی به شمار می‌آیند که از رشد دیگر میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کنند (۱۷). توان ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها، به منظور کاهش میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا حائز اهمیت می‌باشد (۸). لاکتوباسیل‌ها با تولید ترکیباتی نظیر باکتریوسین دارای اثر آنتاگونیستی بر طیف وسیعی از باکتری‌ها هستند (۱۶). این گونه ترکیبات ممکن است متابولیسم باکتری‌های پاتوژن یا سموم آن‌ها را نیز تحت تأثیر قرار دهند (۹).

تاکنون مطالعات بسیاری در مورد جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلف لاکتوباسیل از شیر و فرآورده‌های سنتی و بومی آن، گزارش شده است (۲ و ۴). همچنین تحقیقات وسیع جهت استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک و ترکیبات ضد میکروبی تولید شده توسط این باکتری‌ها مبنی بر اثرات سودمند آن‌ها در صنایع غذایی انجام گرفته است (۱ و ۱۸).

ترخینه غذای فصلی و بومی شناخته شده‌ای است که در استان‌های غربی از جمله: کرمانشاه، کردستان و لرستان به صورت سنتی از مخلوط گندم خرد شده با دوغ غلیظ ترش می‌شود. در برخی از روستاهای استان خراسان نیز از مخلوط بلغور گندم و شیر گوسفند، ماده غذایی با نام غلور شیری و از ترکیب آرد گندم با دوغ، غلور ترش تولید می‌شود که از لحاظ مواد تشکیل دهنده مشابه ترخینه می‌باشند. در تهیه این گونه مواد غذایی سنتی، علاوه بر غلات، از مقادیر زیادی لبنیات استفاده می‌شود. ترخینه، غلور ترش و غلور شیری در فصل تابستان تهیه و بعد از خشک کردن، جهت استفاده در ایام سرد سال نگهداری می‌گردند. مصرف این نوع غذاها از قدیم در فصل زمستان به ویژه در هنگام سرماخوردگی رایج بوده است. افراد بومی اعتقاد دارند که این گونه مواد غذایی طبیعی دارای خواص درمان‌کننده نیز می‌باشند.

در این پژوهش به منظور شناسایی و بهره‌گیری از مواد غذایی سنتی، به بررسی اثر آنتاگونیستی لاکتوباسیل‌های موجود در غلور شیری، ترخینه و غلور ترش پرداخته شد تا در صورت امکان به عنوان پروبیوتیک مطرح و مورد ارزیابی قرار گیرند.

۲- مواد و روش‌ها

به منظور جداسازی، شمارش، تکثیر و فعالیت لاکتوباسیل‌ها از محیط‌های کشت MRS Agar, MRS broth, BHI broth و Muller Hinton Agar استفاده شد. محیط‌ها طبق دستور شرکت تولید کننده آماده و توسط اتوکلاو سترون شدند (مرک، آلمان). مواد غذایی مورد بررسی شامل ۳۵ نمونه ترخینه، ۱۰ نمونه غلور ترش و ۱۵ نمونه غلور شیری بودند. نمونه‌های غذایی از مناطق روستایی استان‌های غربی و شرقی کشور در فصل پاییز و زمستان جمع‌آوری شدند. مواد غذایی پس از انتقال به آزمایشگاه توسط هاون چینی استریل ساییده و به صورت پودر در آمدند.

۲-۱- روش‌های جستجو

برای جستجو و شمارش باکتری در محصولات غذایی، یک گرم از هر نمونه مورد مطالعه توزین و در ۹ سی سی محلول رقیق کننده به صورت سوسپانسیون یکنواخت آماده گردید. سپس از سوسپانسیون اولیه رقت‌های متوالی تهیه شد.

تعیین میزان فراوانی باکتری در هر گرم از ماده غذایی به روش شمارش استاندارد محاسبه شد. برای این منظور یک میلی‌لیتر از هر رقت در کنار شعله به درون پلیت ریخته و سپس ۲۰ میلی‌لیتر از محیط MRS آگار استریل قبل از سرد شدن کامل (۴۵ C°) به آن اضافه گردید. ظروف پتری به آرامی در جهت‌های متفاوت حرکت داده شدند تا باکتری‌ها به طور یکنواخت و به خوبی در محیط کشت پخش شوند. پس از اینکه محیط‌های کشت به صورت جامد در آمدند تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوای گرم خانه گذاری شدند. برای افزایش میزان دقت حداقل دو پلیت از هر رقت کشت داده شد. میانگین شمارش باکتری‌ها در ضریب رقت ضرب و محاسبه گردید.

جهت جداسازی و شناسایی لاکتوباسیل‌ها، ابتدا از سوسپانسیون تهیه شده به لوله‌های حاوی محیط MRS مایع تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در جار بی‌هوای گرم خانه گذاری شدند. سپس از محیط مایع در پلیت

خانه گذاری شدند. پس از رشد کافی روی آن‌ها با پارافین پوشیده و به مدت ۳-۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از حذف پارافین و سانتریفیوژ محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ rpm، مایع رویی آن برداشت شد. از محلول رویی ۵۰ میکرو لیتر بر روی دیسک‌های خام کاغذی (پادتن طب) ریخته شد. دیسک‌ها بعد از خشک شدن با رعایت فاصله مناسب بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی باکتری قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در این روش استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیاکلی با کدورت ۰/۵ مک فارلند به صورت سطحی کشت داده شدند.

ایزوله‌های لاکتوباسیل که در روش دیسک گذاری بیشترین هاله عدم رشد را نشان داده بودند، با استفاده از تخمیر قند های گلوکز، ساکاروز، لاکتوز، مالتوز، رامنوز، گریلوز، آرابینوز، سوکروز، رافینوز، مانیتول و گالاکتوز تعیین گونه شدند (۱۲).

۳- نتایج و بحث

نتایج اولیه جهت مطالعه ایزوله‌های جدا شده از مواد غذایی، طبق آزمون‌های میکروبی و بیوشیمیایی شامل ویژگی‌های کلنی، رنگ آمیزی گرم، مشاهده گرانول‌ها، دمای رشد (۲۴ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد)، آزمون‌های کاتالاز و اکسیداز، بیانگر این مطلب است که هر سه نوع ماده غذایی مورد بررسی حاوی لاکتوباسیل می‌باشند. در شمارش تعداد کلنی‌ها در هر گرم از ماده غذایی خشک، بیشترین میزان فراوانی لاکتوباسیل به ترتیب در نمونه‌های غلور شیری، ترخینه و غلور ترش مشاهده شد (جدول ۱).

ایزوله‌هایی که میانگین قطر هاله‌های مهار رشد آن‌ها بیش از ۱۰ میلی متر بود انتخاب و بر اساس تولیدات ضد میکروبی به روش دیسک گذاری مورد بررسی دقیق تر قرار گرفتند. مطالعه اثر ضد میکروبی سویه‌های لاکتوباسیل جدا شده از نمونه‌های غذایی با استفاده از محلول‌های رویی آن‌ها در روش دیسک گذاری نشان داد که سویه‌های لاکتوباسیل جدا شده از غلور شیری دارای بیشترین تأثیر در جلوگیری از رشد باکتری‌های اندیکاتور بودند به طوری که ۴۵٪ از ایزوله‌های آن، توانایی ایجاد هاله‌های عدم رشد بین ۱۰ تا ۱۵ میلی متر نسبت به باکتری گرم مثبت استافیلوکوک ارئوس و در ۴۰٪ از آن‌ها هاله‌های عدم رشد ۱۵ تا ۲۰ میلی متری نسبت به باکتری گرم منفی اشیریشیا کلی مشاهده شد. کم‌ترین تأثیر آنتی باکتریال در مورد ایزوله‌های غلور ترش دیده شد (جدول

های حاوی محیط MRS آگار به دو صورت پور پلیت و خطی کشت داده شد. پلیت‌ها در شرایط بی‌هوازی تا ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و همچنین تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری و کنترل شدند. کلنی‌ها از نظر ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از تشخیص و تأیید نهایی، تعداد ۶۰ ایزوله جهت ارزیابی اثر ضد میکروبی انتخاب شدند.

۲-۲- آماده سازی باکتری‌های استاندارد

سویه‌های مورد بررسی (نشانگر) شامل: استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC1113) و اشیریشیاکلی (ISIRI 1552) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. باکتری‌های نشانگر، ابتدا در محیط مایع BHI و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت احیا شدند. سپس هر یک از باکتری‌ها در محیط‌های اختصاصی کشت و تحت آزمون‌های بیوشیمیایی قرار گرفتند. از هر سویه، سوپانسیون باکتریایی با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند ($10^8 \times 1/5$) آماده شد.

۲-۳- روش‌های بررسی اثر ضد میکروبی

برای سنجش اثر آنتاگونیستی لاکتوباسیل های جدا شده از نمونه‌های غذایی، از روش‌های کشت نقطه‌ای و دیسک گذاری استفاده شد.

در روش کشت نقطه‌ای، ابتدا به صورت جداگانه، هر باکتری نشانگر (استافیلوکوک اورئوس و اشیریشیاکلی) با کدورت ۰/۵ مک فارلند بر سطح محیط مولر هینتون آگار، به صورت به طور یکنواخت کشت داده شدند. سپس کلنی‌هایی که به عنوان لاکتوباسیل جدا سازی و شناسایی شده بودند، توسط آنس سترون به صورت نقطه‌ای بر روی محیط تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری گردیدند. پلیت‌ها از لحاظ توانایی هر ایزوله در جلوگیری از رشد باکتری‌های نشانگر، مورد بررسی قرار گرفتند.

ایزوله‌هایی که در روش کشت نقطه‌ای دارای توانایی مهار رشد مناسب بودند، جهت مطالعه در روش دیسک گذاری انتخاب شدند. در روش دیسک گذاری از محلول رویی کشت لاکتوباسیل‌ها استفاده گردید. برای تولید مواد ضد میکروبی توسط لاکتوباسیل‌ها، ابتدا ایزوله‌ها به محیط MRS مایع تلقیح و گرم

باکتریوسیدی می‌باشد (۳). Miyamoto و همکاران در سال ۲۰۰۰ تولید باکتریوسین توسط لاکتوباسیل ها را از دلایل اصلی جهت جلوگیری از رشد باکتری گرم منفی روده‌ای ذکر نمودند (۱۰). گزارش Ogunbanw و همکاران در سال ۲۰۰۳ مبنی بر فعالیت ضد میکروبی و تولید باکتریوسین توسط لاکتوباسیل پلانتاروم حاکی از این است که این لاکتوباسیل از رشد اشریشیا کلی و باسیلوس سرئوس و پرسینیا انترو کولیتیکا جلوگیری می‌کند (۱۱). در بررسی حاضر نیز بهترین اثر باز دارندگی علیه باکتری‌های نشانگر، توسط محلول رویی کشت لاکتوباسیلوس کازه ای و لاکتوباسیل پلانتاروم جدا شده از نمونه‌های غذایی، ایجاد شده بود که با نتایج تحقیقات قبلی هم سویی دارد.

مطالعات نشان داده است که بعضی از باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در فرآورده‌های غذایی مانند لاکتوباسیل ها به عنوان پروبیوتیک عمل می‌کنند (۵). لاکتوباسیل ها علاوه بر ایجاد طعم مطلوب غذا، دارای اثر محافظت کننده‌ای برای مصرف کننده نیز می‌باشند. تحقیقات بسیاری بیانگر این واقعیت می‌باشند که مصرف خوراکی پروبیوتیک ها، اثرات پیشگیری کننده و درمانی بر روی بیماری‌های باکتریایی روده‌ای دارند. در حقیقت مصرف لاکتوباسیل ها می‌تواند علاوه بر تولید باکتریوسین، باعث تحریک سیستم ایمنی و افزایش پاسخ ایمنی هومورال شود (۶، ۷، ۱۳ و ۱۴). چنانچه در گزارش Turchet ذکر شده که مصرف لاکتوباسیل کازه ای در افراد مسن، باعث کاهش ۲۰ درصدی طول دوره عفونت‌های گوارشی و تنفسی در فصل زمستان می‌شود (۱۵). Mack و همکاران در گزارش خود بیان کردند که مصرف لاکتوباسیل پلانتاروم می‌تواند باعث کاهش تعداد باکتری‌های انتروباکتریاسیه در روده شود زیرا این باکتری با افزایش تولید موسین های روده‌ای از اتصال اشریشیا کلی به جدار روده جلوگیری می‌کند (۹). به همین دلیل استفاده از غذاهای محلی جهت درمان برخی از بیماری‌ها، از دیر باز متداول بوده است. به نظر می‌رسد که مردم بومی مناطق کردستان، خراسان و لرستان نیز از غذاهای سنتی مورد مطالعه، در درمان بیماری‌ها مخصوصاً در فصل زمستان، استفاده می‌کنند.

(۲). بررسی و مقایسه نتایج، بیانگر این مطلب است که اثرات آنتاگونیستی با توجه به شعاع هاله‌های عدم رشد بر علیه باکتری‌های نشانگر به ترتیب در مورد غلور شیری، ترخینه و غلور ترش ارزیابی شد که در مجموع با توزیع فراوانی لاکتوباسیل ها در ماده غذایی رابطه مستقیم داشت (جدول ۱).

جدول ۱- توزیع فراوانی لاکتوباسیل ها در یک گرم ماده غذایی خشک

تعداد کلنی	مواد غذایی
۶×۱۰ ^۵	غلور شیری
۳×۱۰ ^۳	ترخینه
۲×۱۰ ^۲	غلور ترش

امروزه تحقیقات علمی، جهت دستیابی به فرآورده‌های غذایی حاوی میکروارگانیسم های مفید با خواص درمانی و ارزش تغذیه‌ای در اروپا و آسیا رو به افزایش است و این امر در کشور ایران نیز مشاهده می‌شود. این تحقیق به عنوان اولین گام مبنی بر حضور لاکتوباسیل در این گونه مواد غذایی بومی، در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت و نتایج حاکی از تأثیر لاکتوباسیل های جدا شده از نمونه‌های غذایی و پیشگیری از رشد استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی بود.

اثرات آنتاگونیستی لاکتوباسیل ها در روش دیسک گذاری نسبت به روش کشت نقطه‌ای، دقیق تر و بارزتر بود. در این راستا بهترین فعالیت ضد میکروبی توسط سویه‌های لاکتوباسیل کازه ای و لاکتوباسیل پلانتاروم شناسایی شدند که میانگین قطر هاله عدم رشد آن‌ها به ترتیب ۱۸ و ۱۵ میلی متر مشاهده شد. اثر حفاظتی لاکتوباسیل ها در ایفای نقش مهارکنندگی می‌تواند به دلیل تولیدات ضد میکروبی از جمله باکتریوسین ها در محلول رویی کشت باشد (۱۶).

نور بخش در سال ۱۳۷۹ اثر فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس های جدا شده از لبنیات را بر روی باکتری‌ها از جمله اسنافیلوکوک اورئوس و اشریشیا کلی بررسی کرد. اثر ممانعت از رشد بر روی استافیلوکوک اورئوس قوی تر از سایر باکتری‌های مورد آزمایش بود (۲).

Conconnier و همکاران در سال ۱۹۹۸ گزارش کردند که محلول رویی کشت لاکتوباسیل ها از جمله کازه ای دارای اثر

جدول ۲- مقایسه در صد نسبی توان ضد میکروبی ایزوله‌های لاکتوباسیل جدا شده از نمونه‌های غذایی بر علیه باکتری‌های نشانگر در روش دیسک گذاری

هاله عدم رشد (۱۵-۲۰) میلی متر			هاله عدم رشد (۱۰-۱۵) میلی متر			در صد هاله عدم رشد
غلیظ ترش	غلیظ شیری	ترخینه	غلیظ ترش	غلیظ شیری	ترخینه	
٪۱۰	٪۳۰	٪۳۰	٪۲۵	٪۴۵	٪۲۵	استافیلوکوک اورئوس
٪۱۵	٪۴۰	٪۱۵	٪۲۰	٪۳۵	٪۴۰	اشریشیا کلی

۶- منابع

- ۱- پور احمد، ر. ۱۳۸۲. استفاده از سویه‌های میکروبی بومی در تولید ماست، پایان نامه دکترای صنایع غذایی دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، ص ۹۸ تا ۱۱۵.
- ۲- نور بخش، ف. ۱۳۷۹. فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیل های جدا شده از لبنیات بر روی استافیلوکوک اورئوس، باسیلوس، سودوموناس آئروجینوزا، اشریشیا کلی و لیستریا مونوسیژنوز، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.

- 3- Coconnier MH, Lievin V, Hemery E and Servin AL. 1998. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl Environ Microbiol.* 64(11):4573-4580.
- 4- Dave RI and Shah NP. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Int Dairy.* 7(1): 31-41.
- 5- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- 6- Gronlund M, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen O and Isolauri E. 2000. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 83(3):186-192.
- 7- Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S and Arvilommi H. 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res.* 32(2):141-4.
- 8- Lindgren SE and Dobrogosz WJ. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Rev.* 7(1-2):149-63.
- 9- Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall Land Hollingsworth MA. 1999. Probiotics

با توجه به اینکه غلیظ شیری، ترخینه و غلیظ ترش به مقدار انبوه در فصل زمستان، مورد استفاده قرار می‌گیرند و مردم بومی در یافته‌اند که در اثر مصرف آن بهبود می‌یابند، احتمالاً تولید ترکیبات ضد میکروبی توسط لاکتوباسیل، جایگزینی و استقرار آن‌ها در دستگاه گوارش و همچنین کاهش pH مانع از رشد باکتری‌های پاتوژن می‌شود و در نهایت به حفظ سلامتی مصرف کننده کمک می‌نماید.

۴- نتیجه گیری

با در نظر گرفتن اهمیت و به کار گیری پروبیوتیک ها در فرآورده‌های غذایی، شناخت انواع غذاهای سنتی و بومی ایرانی حاوی لاکتوباسیل ها اهمیت ویژه ای دارد. اگرچه مکانیسم‌های محافظتی پروبیوتیک ها هنوز به طور کامل شناخته نشده است اما به نظر می‌رسد اثر آنتاگونیستی مواد تولید شده توسط این باکتری‌ها بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها، می‌تواند نقش مهمی در نگهداری محصولات غذایی و تغذیه افراد نسل آینده ایفا کند.

۵- سپاس گذاری

بدین وسیله از خانم دکتر سهیلا مرادی بید هندی عضو هیأت علمی موسسه واکسن و سرم سازی رازی و همکاران آزمایشگاه میکروبی شناسی که در تأمین امکانات لازم جهت انجام پروژه ما را یاری نمودند سپاس گذاری می‌نمایم.

- inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol.* 276:G941-50.
- 10- Miyamoto T, Horie T, Fujiwara T, Fukata T, Sasai K and Baba E. 2000. *Lactobacillus* flora in the cloaca and vagina of hens and its inhibitory activity against *Salmonella enteritidis* in vitro. *Poultry. Sci.* 79(1) : 7-11.
 - 11- Ogunbanwo ST, Sanni AI and Onilude AA. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African J Biotec.* 2(8) :219-227.
 - 12- Sneath A, Mair NS, Sharpe HE, and Holt J G. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. Williams & Wilkins. Baltimore.
 - 13- Sütas Y, Hurme M and Isolauri E. 1996. Down-regulation of anti-CD3 antibody-induced IL-4 production by bovine caseins hydrolysed with *Lactobacillus* GG-derived enzymes. *Scand J Immunol.* 43(6) :687-689.
 - 14- Sütas Y, Soppi E, Korhonen H, Syväoja EL, Saxelin M, Rokka Tand Isolauri E. 1996. Suppression of lymphocyte proliferation in vitro by bovine caseins hydrolyzed with *Lactobacillus casei* GG-derived enzymes. *J Allergy Clin Immunol.* 98(1) :216-224.
 - 15- Turchet P, Laurenzano M, Auboiron S and Antoine JM. 2003. Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *J Nutr Health Aging.* 7(2) :75-77.
 - 16- Vuyst DL, and Leroy F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 13:194-199.
 - 17- Wadher KJ, Mahore JG and Umekar MJ. 2010. Probiotics: living medicines in health maintenance and disease prevention. *Int J Pharma and Bio Sci.* 1(3) : 1-9.
 - 18- Ziemer CJ and Gibson GR. 1998. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal.* 8 (5) :473-479.