INSO
19459
1st.Edition
2014

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۱۹۴۵۹
چاپ اول
۱۳۹۲

میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون (برون‌تن)

Probiotic microorganisms- Specifications and In Vitro test methods

ICS: 07.100.30

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است .

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان ، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود . پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب ، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود . بدین ترتیب ، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] ،کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند . در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور ، از آخرین پیشرفت های علمی ، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود .

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون ، برای حمایت از مصرف کنندگان ، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی ، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی ، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/ یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید.

سازمان می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور ، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید . همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره ، آموزش ، بازرسی ، ممیزی و صدور گواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی ، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم ، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می کند . ترویج دستگاه بین المللی یکاها ، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2 - International Electrotechnical Commission
3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون (برون‌تن)»

رئیس :	سمت و/ یا نمایندگی
مختاری- فهیم دخت (فوق لیسانس ایمونولوژی)	پژوهشگاه استاندارد
دبیر :	
حیدرپور، مژگان (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	پژوهشگاه استاندارد
اعضاء : (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
افشین پژوه، (دکترای صنایع غذایی)	شرکت زرماکارون
اکبری سلطانی، شهرو (فوق لیسانس بیوتکنولوژی)	سازمان استاندارد
تابنده، فاطمه (دکترای تخصصی بیوتکنولوژی)	پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ایران
تاج‌آبادی ابراهیمی ، مریم (دکترای تخصصی میکروبیولوژی)	انجمن پروبیوتیک و غذاهای فراسودمند
جعفری، پروانه (دکترای تخصصی میکروبیولوژی)	شرکت تک ژن زیست
حجازی، محمد امین (دکترای تخصصی بیوتکنولوژی)	کانون فراورده‌های تخمیری ایران
حسینی، فاطمه (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت زیست تخمیر
حیدرزاده، مرجان (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	پژوهشگاه استاندارد

خدایی، زهره (دکترای تخصصی میکروبیولوژی)	دانشگاه علوم پزشکی البرز- دانشکده پزشکی
دبیریان، شهریار (دکترای تخصصی بهداشت مواد غذایی)	صنایع شیر ایران
رحیمی فرد، ناهید (دکترای تخصصی میکروبیولوژی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی مرکز آزمایشگاههای مرجع کنترل غذا و دارو
سید یعقوبی، امین (دکترای صنایع غذایی)	شرکت زرماکارون
طباطبایی، سید هادی (لیسانس مهندسی کشاورزی)	شرکت تین دامداران
ظهیر اقدم، حسین (فوق لیسانس صنایع غذایی)	شرکت پیشگامان پخش صدیق نمایندگی کریستین هنسن
عزیز محسنی، فرزانه (دکترای تخصصی فراورده‌های بیولوژیک)	سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
عطار، فرنوش (دکترای تخصصی بیوشیمی)	پژوهشگاه استـاندارد
قاسم‌پور، غلامرضا (فوق لیسانس صنایع غذایی)	سازمان ملی استـاندارد ایران
محبعلی، حدیث (لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت زیست تخمیر
مژگانی، ناهید (دکترای تخصصی میکروبیولوژی)	مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
یدی، اکرم (لیسانس صنایع غذایی)	شرکت تین (دامداران)
یوسف‌زاده، هنگامه (لیسانس صنایع غذایی)	سازمان ملی استـاندارد ایران

فهرست مندرجات

	عنوان	صفحه
	آشنایی با سازمان ملی استاندارد	ب
	کمیسیون فنی تدوین استاندارد	ج
	پیش گفتار	و
	مقدمه	ز
۱	هدف	۱
۲	دامنه کاربرد	۱
۳	مراجع الزامی	۱
۴	اصطلاحات و تعاریف	۲
۵	ویژگی‌ها	۳
۶	روش‌های آزمون	۵
۷	نشانه‌گذاری	۱۴
۸	برگه اطلاعات فنی	۱۴
	پیوست الف (اطلاعاتی) اثبات ادعاهای سلامت‌بخش	۱۵
	پیوست ب (اطلاعاتی) کتاب‌نامه	۲۰

پیش گفتار

استاندارد "میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون" که پیش‌نویس آن درکمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده و در سیصد و چهل وششمین اجلاس کمیتهٔ ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ۱۳۹۲/۱۱/۱۶ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.
برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.
منبع و مأخذی که برای تهیهٔ‌ی این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:
۱- تحقیقات انجام شده در پژوهشگاه استاندارد طی طرح پژوهشی "بررسی استارترهای مورد مصرف در صنایع لبنی به روش PCR" به شماره ۴-M-۸۸ مصوب ۱۳۸۸/۱۲/۱۵
۲ - تحقیقات انجام شده در انجمن پروبیوتیک و غذاهای فراسودمند، شرکت زیست تخمیر و شرکت تین دامداران، تحت عنوان "ارزیابی ایمنی و کارایی پروبیوتیک‌ها"

3- Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002, Report of, Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.

مقدمه

در مورد بسیاری از غذاها سطحی از ایمنی غذا که بطور معمول توسط جامعه مورد پذیرش قرار میگیرد، بازتاب تاریخچه مصرف ایمن آن توسط انسان میباشد.

میکروارگانیسم‌های زنده‌ای که در طول تاریخ زندگی بشر به صورت بخشی طبیعی از رژیم غذایی انسان درآمده‌اند. باوجود افزایش مداوم استفاده از پروبیوتیک‌ها، شواهد نادری از اثرات سوء ناشی از استفاده از پروبیوتیک ها گزارش شده است. ایمنی این میکروارگانیسم‌ها که بطور سنتی به‌عنوان غذا و یا بخشی از غذا مورد استفاده قرار می‌گرفتند، مورد تأیید قرار گرفته است. باکتری‌هایی مانند لاکتوباسیل‌ها، بیفیدوباکتریوم‌ها و لوکونوستوک‌ها از جمله میکروب‌های طبیعی هستند که در طول سالیان متمادی در انواع مواد غذایی در همه نقاط دنیا مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

تعیین ویژگی‌ها و ایمنی پروبیوتیک‌ها مسئله مهمی به‌شمار می‌رود، بخصوص در مورد سویه‌های جدیدی که احتمال داده می‌شود دارای تمام ویژگی‌های پروبیوتیکی نباشند. در سال‌های اخیر تلاش‌های وسیعی به منظور شناسایی و جداسازی سویه‌های جدید دارای خواص پروبیوتیک از منابع مختلف به عمل آمده و در حال حاضر همه دست‌اندرکاران توافق دارند که یک سویه جدید معرفی شده بعنوان پروبیوتیک نه تنها باید ایمن باشد بلکه مؤثر بودن و پایداری آن در محصول نهایی و نیز اثرات سودمند آن در مصرف‌کنندگان باید مورد بررسی و تأیید مراجع قانونی قرار گیرد.

تعیین ویژگی‌های پروبیوتیک‌ها با شناسایی صحیح سویه آغاز می‌شود. آزمون‌های به کار رفته در تعیین ویژگی و ارزیابی ایمنی پروبیوتیک‌ها، شامل روش‌های برون‌تن (آزمایشگاهی) است که با استفاده از آنها ویژگی‌های مختلف سویه‌ها نظیر مقاومت به آنتی‌بیوتیک یا تولید متابولیت سمی بررسی می‌شود. علاوه بر آن، میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک باید هنگام عبور از دستگاه گوارش بتوانند زنده بمانند و قابلیت تکثیر و چسبندگی در دستگاه گوارش را نیز داشته باشند. این بدان معنی است که این میکروارگانیسم‌ها باید به شیره معده مقاوم بوده و در حضور املاح صفراوی مشابه روده مقاومت داشته باشند. در مورد سویه‌هایی که ادعاهایی مانند کاهش کلسترول یا هیدرولیز اسیدهای صفراوی را دارند، آزمون‌های اثبات ادعا نیز باید انجام شود.

علاوه بر روش‌های آزمایشگاهی می‌توان برای بررسی احتمال عبور پروبیوتیک‌ها از روده انسان و ورود به گردش خون میزبان و بافت‌ها و یا برای تعیین کارایی و صحت ادعاهای سلامت‌بخش آن‌ها باید از مدل‌های حیوانی استفاده شود.

به منظور کنترل کشت‌های پروبیوتیک بهتر است تولیدکنندگان و عرضه‌کنندگان از سیستم‌های مدیریت کیفیت و روش‌های اجرایی براساس برنامه‌های مدون از پیش تعیین شده براساس اصول تجزیه و تحلیل احتمال خطر نقاط کنترل بحرانی، و شرایط خوب ساخت استفاده کنند.

میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون (برون‌تن)

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین ویژگی‌ها و روش‌های آزمون کشت‌های میکروبی است که به ماده غذایی افزوده می‌شوند تا باعث ایجاد خصوصیت پروبیوتیک در آن ماده غذایی شوند، و/ یا به اشکال مختلف به عنوان مکمل غذایی عرضه می‌شوند.

۲ دامنه کاربرد

این استاندارد برای تمام میکروارگانیسم‌های طبیعی که ادعای پروبیوتیک داشته، و در اشکال مختلف بصورت زنده خشک شده یا مایع بصورت تک سویه یا مخلوط در فرایند تولید مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند، یا به‌عنوان مکمل‌های غذایی عرضه می‌شوند، کاربرد دارد.

این استاندارد، برای پروبیوتیک‌هایی که در خوراک دام بکار می‌رود، کاربرد ندارد.

۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن‌ها ارجاع داده شده است . بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می‌شود.

در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدید نظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدید نظر و اصلاحیه‌های بعدی آن‌ها مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۳-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۲۴- میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش شمارش باسیلوس سرئوس احتمالی به روش شمارش کلنی در دمای ۳۰ o C

۳-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۲۴۶۱- میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جامع برای جستجو ،شناسایی و شمارش آنتروباکتریاسه- قسمت اول- جستجو،شناسایی و شمارش به شیوه محتمل ترین تعداد (MPN) با پیش غنی سازی

۳-۳ استاندارد ملی ایران۲-۲۴۶۱- میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -روش جامع برای جستجو، شناسایی و شمارش آنتروباکتریاسه- قسمت دوم -روش شمارش کلنی

۳-۴ استاندارد ملی ایران شماره ۴۴۱۳- شیر و فرآورده های آن – جستجو و شناسایی سالمونلا

۳-۵ استاندارد ملی ایران شماره ۴۷۲۱- روش شمارش باکتری‌های لاکتیک

۳-۶ استاندارد ملی ایران شماره ۵۲۳۴- شیر و فرآورده‌های آن- شمارش اشریشیا کلی- روش بیشترین تعداد احتمالی(MPN)

۳-۷ استاندارد ملی ایران شماره ۵۸۶۴- میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- اسپورهای طنابی ـ روش جستجو و شمارش

۳-۸ استاندارد ملی ایران ۱-۶۸۰۶- میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- شمارش استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس ارئوس و سایر گونه‌ها) -روش آزمون- قسمت اول: روش استفاده از محیط کشت برد- پارکراگار)

۳-۹ استاندارد ملی ایران ۲-۶۸۰۶- میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه‌ها) قسمت دوم- روش استفاده از محیط کشت رابیت پلاسما فیبرینوژن آگار

۳-۱۰ استاندارد ملی ایران ۳-۶۸۰۶- میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه ها)قسمت سوم- جستجو، شناسایی و شمارش به شیوه محتمل ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانیسم

۳-۱۱ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۰۳۵- میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جامع برای جستجو و شمارش لیستریا مونوسایتوژنز - قسمت اول- روش جستجو و شناسایی

۳-۱۲ استاندارد ملی ایران ۸۲۴۸- کره- شیرهای تخمیری و پنیرتازه- شمارش میکروارگانیسم‌های آلوده کننده- روش شمارش کلی در ۳۰ درجه سیلسیوس- روش آزمون میکروبیولوژی

۳-۱۳ استاندارد ملی ایران شماره ۹۲۶۶- اندازه گیری مقدار سرب،کادمیم ،مس،آهن و روی-روش طیف سنجی نوری جذب اتمی

۳-۱۴ استاندارد ملی ایران شماره ۹۴۳۲- میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -روش جامع برای شمارش باکتری‌های احیاء کننده سولفیت در شرایط بی‌هوازی

۳-۱۵ استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹- میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- راهنمای الزامات کلی برای آزمون

۳-۱۶ استاندارد ملی ایران ۱۰۱۵۴- شیر و فراورده های آن- شمارش واحدهای تشکیل دهنده کلنی کپک و یا مخمر- شمارش کلنی در پلیت در دمای $۲۵\ ^{\circ}C$

۳-۱۷ استاندارد ملی ایران ۱۲۹۶۸- خوراک انسان- دام- بیشینه رواداری فلزات سنگین

۳-۱۸ استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۰۹۴- فراورده‌های تخمیری شیر-کشت‌های آغازگر باکتریایی-تعیین هویت

۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و تعاریف زیر به‌کار می‌رود:

۴-۱ پروبیوتیک

میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به میزان کافی در دسترس میزبان قرار گیرند، باعث ایجاد خواص سلامت بخش می‌شوند.[۱]

۱- تعریف براساس مدرک FAO/WHO ارائه شده است.

۴-۲ مکمل غذایی[1]

منابع تغلیظ شده‌ای از مواد مغذی و یا دیگرترکیبات با تأثیرات تغذیه‌ای یا فیزیولوژیکی هستند که به منظور تکمیل یا غنی‌سازی رژیم غذایی طبیعی بکار برده می‌شوند.

یادآوری- این فراورده‌ها در فرم تعیین دوز شده[2] به صورت قرص، کپسول و مایع در مقادیر معین به بازار ارائه می‌شوند[3].

۵- ویژگی‌ها

۵-۱ هر کشت میکروبی پروبیوتیک باید با ویژگی‌های جدول شماره ۱ مطابقت داشته باشد.

۵-۲ برای اثبات ادعاهای سلامت بخش، ارائه مستندات بالینی مورد تأیید مراجع ذیصلاح قانونی الزامی است. برخی از روش‌های ارزیابی ادعاها در پیوست الف شرح داده شده است.

1- Supplement
2- Indose
3-Europa.eu/food/food/labellingnutrition/supplement

جدول ۱- ویژگی‌های سویه پروبیوتیک

ردیف	ویژگی	قابل قبول	روش آزمون
۱	تعیین هویت	طبق ادعای روی برچسب در حد جنس/ گونه/ سویه	طبق بند ۶-۱ این استاندارد و براساس استانداردهای ملی و بین‌المللی مرتبط
۲	آلودگی با میکروارگانیسم‌های بیماریزا و عوامل فساد	طبق جداول ۲ ، ۳ و ۴	طبق بند ۶- ۲ این استاندارد
۳	فعالیت همولیتیک	منفی	طبق بند ۶- ۳ این استاندارد
۴	بررسی ژن‌های قابل انتقال مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج	منفی	در دست تدوین
۵	مقاومت به اسید	پس از تیمار، تعداد شمارش شده کمتر از $۱۰^{۶}$ نباشد.	طبق بند ۶- ۵ این استاندارد
۶	مقاومت به شیره معده (پپسین، تریپسین)	پس از تیمار، تعداد شمارش شده کمتر از $۱۰^{۶}$ نباشد.	طبق بند ۶- ۶ این استاندارد
۷	مقاومت به نمک‌های صفراوی (بایل)	ضریب بازدارندگی مساوی یا کمتر از ۰/۴ باشد.	طبق بند ۶- ۷ این استاندارد
۸	اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه گوارش	نسبت اتصال حداقل ۱ به ازای هر سلول شمارش شده	طبق بند ۶- ۸ این استاندارد
۹	فلزات سنگین	مجموع طبق جدول شماره ۲ استاندارد ۱۲۹۶۸ کمتر از ۱۰ ppm	طبق استاندارد ملی ایران ۹۲۶۶
۱۰	آنزیم کاتالاز	منفی (فقط در محصولات شیرخواران و غذای کودک)	طبق بند ۶- ۱۰ این استاندارد
۱۱	هیدرولیز ال- آرژینین	منفی (فقط در محصولات شیرخواران و غذای کودک)	طبق بند ۶- ۱۱ این استاندارد
۱۲	شمارش هر گونه میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک	مطابق با ادعای روی برچسب و حداقل $۱۰^{۷}$ در هر گرم یا میلی‌لیتر	طبق استانداردهای ملی و بین‌المللی مرتبط

۶- روش‌های آزمون

۶-۱ شناسایی میکروارگانیسم پروبیوتیک

شناسایی سویه پروبیوتیک باید در سطح سویه و با روش‌های فنوتیپی (بند ۶-۱-۱) و ژنوتیپی (بند ۶-۱-۲) انجام شود.

۶-۱-۱ روش‌های فنوتیپی

۶-۱-۱-۱ تشخیص و تأیید میکروارگانیسم پروبیوتیک ادعا شده باید با استفاده از محیط‌های کشت افتراقی و اختصاصی و آزمون‌های بیوشیمیایی، و طبق استانداردهای ملی یا بین المللی موجود یا روش‌های معتبر انجام شود.

۶-۱-۲ روش‌های ژنوتیپی

تشخیص و تأیید گونه میکروارگانیسم پروبیوتیک ادعا شده باید بوسیله تکثیر نواحی DNA ریبوزومی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شود و در صورت نیاز با روش های تشخیصی تکمیلی مورد تایید قرار گیردو تأیید نتایج PCR با روش توالی‌یابی ضروری است.

تولیدکنندگان و واردکنندگان موظف هستند از سویه‌هایی استفاده کنند که کلیه اطلاعات مربوط به آنها در کلکسیون‌های میکروبی معتبر ثبت شده باشد. ارائه توالی ژنتیکی و شناسنامه میکروارگانیسم مورد ادعا توسط تولیدکننده الزامی است.

در صورت نیاز، از روش‌های تشخیصی تکمیلی استفاده گردد.

یادآوری- تولیدکنندگان داخلی در مورد سویه‌های بومی موظف به تهیه شناسنامه و ثبت آن در حداقل یکی از کلکسیونهای معتبر میکروبی می‌باشند.

۶-۲ آلودگی‌های میکروبی

کشت‌های پروبیوتیک باید از نظر آلودگی‌های میکروبی برحسب نوع فرایند بسته‌بندی (کشت مایع/ منجمد یا خشک) مطابق با جداول شماره ۲ و ۳ و۴ باشند.

تولیدکنندگان برای جلوگیری از آلودگی احتمالی، باید اقدامات کنترلی لازم را انجام دهند.

جدول ۲ – آلودگی‌های میکروبی کشت‌های پروبیوتیک باکتریایی لاکتیک

ویژگی	حد مجاز (cfu/g, ml)	روش آزمون
باکتری‌های غیرلاکتیک (فقط برای محصولات تخمیری)	حداکثر ۵۰۰ [1]	استاندارد ملی ایران شماره ۸۲۴۸
مخمرها و کپک‌ها	کمتر از ۱۰ (محصولات تخمیری)	استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۱۵۴
	$۱۰^{۲}$ (محصولات غیرتخمیری)	
انتروباکتریاسه‌ها	کمتر از ۱۰	استانداردهای ملی ایران شماره ۱- ۲۴۶۱ و ۲- ۲۴۶۱
استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت	منفی	استانداردهای ملی ایران شماره ۱- ۶۸۰۶ و ۲- ۶۸۰۶و ۳- ۶۸۰۶
اشریشیا کلی	منفی	استاندارد ملی ایران شماره ۵۲۳۴
گونه‌های *سالمونلا*	منفی	استاندارد ملی ایران شماره ۴۴۱۳
باسیلوس سرئوس	کمتر از ۱۰۰	استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۲۴
شمارش باکتری‌های احیاء کننده سولفیت	کمتر از ۱۰	استاندارد ملی ایران ۹۴۳۲
لیستریا منوسایتوژنز	منفی	استاندارد ملی ایران ۱- ۸۰۳۵

جدول ۳ – آلودگی‌های میکروبی کشت‌های پروبیوتیک باکتریایی غیرلاکتیک

ویژگی	حد مجاز (cfu/g, ml)	روش آزمون
مخمرها و کپک‌ها	$۱۰^{۲}$	استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۱۵۴
انتروباکتریاسه‌ها	کمتر از ۱۰	استانداردهای ملی ایران شماره ۱- ۲۴۶۱ و ۲- ۲۴۶۱
استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت	منفی	استانداردهای ملی ایران شماره ۱- ۶۸۰۶ و ۲- ۶۸۰۶و ۳- ۶۸۰۶
اشریشیا کلی	منفی	استاندارد ملی ایرانشماره ۵۲۳۴
گونه‌های سالمونلا	منفی	استاندارد ملی ایران شماره ۴۴۱۳
باسیلوس سرئوس	کمتر از ۱۰۰	استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۲۴
شمارش باکتری‌های احیاء کننده سولفیت	کمتر از ۱۰	استاندارد ملی ایران ۹۴۳۲
لیستریا منوسایتوژنز	منفی	استاندارد ملی ایران۱- ۸۰۳۵

جدول ۴ – آلودگی‌های میکروبی کشت‌های پروبیوتیک مخمری

ویژگی	حد مجاز (cfu/g, ml)	روش آزمون
کپک‌ها	$۱۰^{۲}$	استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۱۵۴
انتروباکتریاسه‌ها	کمتر از ۱۰	استانداردهای ملی ایران شماره ۱- ۲۴۶۱ و ۲- ۲۴۶۱
استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت	منفی	استانداردهای ملی ایران شماره ۱- ۶۸۰۶ و ۲- ۶۸۰۶و ۳- ۶۸۰۶
اشریشیا کلی	منفی	استاندارد ملی ایران شماره ۵۲۳۴
گونه‌های سالمونلا	منفی	استاندارد ملی ایران شماره ۴۴۱۳
باسیلوس سرئوس	کمتر از ۱۰۰	استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۲۴
شمارش باکتری‌های احیاء کننده سولفیت	کمتر از ۱۰	استاندارد ملی ایران ۹۴۳۲
لیستریا منوسایتوژنز	منفی	استاندارد ملی ایران ۱- ۸۰۳۵
باکتری‌های لاکتیک	۱۰۰۰	استاندارد ملی ایران۴۷۲۱
اسپور باکتری‌های طنابی شکل	۱۰	استاندارد ملی ایران ۵۸۶۴

۶-۳ فعالیت همولیتیک

۶-۳-۱ اساس روش

بررسی لیز گلبول‌های قرمز خون گوسفندی با کشت میکروارگانیسم بر روی محیط کشت آگاردار حاوی خون گوسفند انجام می‌شود.

۶-۳-۲ روش آزمون

میکروارگانیسم ایزوله شده را بر روی محیط کشت آگار خون‌دار (محیط پایه حاوی ۷% خون گوسفندی دفیبرینه) به روش نقطه‌ای کشت دهید. پلیت‌ها را بصورت وارونه در دما و شرایط مناسب گرمخانه‌گذاری کنید. پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها را از نظر وجود هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها بررسی نمایید. وجود هاله شفاف نشاندهنده واکنش مثبت و همولیز نوع بتا است. از *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC ۲۵۹۲۳) به عنوان کنترل مثبت استفاده کنید.

۶-۴ انتقال ژن‌های قابل انتقال مقاومت به آنتی بیوتیک‌های رایج

هر سویه پروبیوتیک از لحاظ انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج انسانی که قابل انتقال هستند، مورد بررسی قرار گیرد.

۶-۴-۱ روش آزمون

در دست تدوین.

۶-۵ مقاومت به اسید

۶-۵-۱ اساس روش

بررسی مقاومت میکروارگانیسم در شرایط اسیدی، با کشت میکروارگانیسم در محیط کشت مایع که pH آن کاهش داده شده انجام می‌شود. پس از گرمخانه گذاری در دما و زمان مناسب تعداد میکروارگانیسم باقیمانده شمارش می‌شود.

۶-۵-۲ روش آزمون:

۶-۵-۲-۱ تهیه سوسپانسیون میکروبی

میکروارگانیسم‌ها را در محیط مایع مناسب در دما و زمان مناسب گرمخانه‌گذاری کنید. محیط کشت رشد یافته را در دور ۵۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده، پس از خالی کردن مایع رویی رسوب را با بافر فسفات (PBS) ۰/۱ مولار(pH=7) شستشو داده، پس از سانتریفوژ و خالی کردن مایع رویی، سوسپانسیون را با بافر فسفات (PBS) به کدورت معادل نیم مک‌فارلند برسانید. این سوسپانسیون می‌تواند در همه آزمون‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

۶-۵-۲-۲ روش آزمون مقاومت به اسید

یکصد میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (طبق بند ۶-۵-۲-۱) را در تعداد مناسب لوله‌های حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مایع مناسب که اسیدیته آنها بوسیله اسید مناسب (استیک اسید گلاسیال یا کلریدریک اسید) در دو pH ۴ و ۲/۵ تنظیم شده و در دما و زمان مناسب گرمخانه‌گذاری کنید.

پس از گذشت ۳ و ۴ ساعت از گرمخانه‌گذاری از محیطهای کشت تلقیح شده یک میلی‌لیتر برداشته و در محیط کشت آگاردار مناسب تلقیح کرده و پس از گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مناسب طبق استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹ شمارش کنید. تعداد شمارش شده نباید کمتر از $۱۰^{۶}$ باشد.

۶-۶ مقاومت به شیره معده (پپسین، تریپسین)

۶-۶-۱ اساس روش:

بررسی مقاومت به شرایط اسیدی معده، با کشت میکروارگانیسم در محیط‌های کشت مایع شبیه‌سازی شده با معده، حاوی پپسین و تریپسین، گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مناسب، کشت خطی بر روی محیط کشت آگاردار مناسب، گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مناسب و بررسی رشد یا عدم رشد انجام می‌شود.

۶-۶-۲ مواد مورد نیاز:

۶-۶-۲-۱ اسید معده مصنوعی

۱- محیط حاوی پپسین

الف- ترکیبات

کلرید سدیم	۲ گرم
پپسین	۲/۳ گرم

آب مقطر	تا ۱۰۰۰ میلی‌لیتر

ب- طرز تهیه:

مواد فوق را در مقدار مناسبی آب حل کرده، و حجم را به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید و با مقدار مناسب (حدود ۷ میلی لیتر) اسید کلریدریک غلیظ pH آن را در ۲/۳-۲ تنظیم کرده.

محیط مشابهی به عنوان کنترل تهیه کرده و pH آن را با با هیدروکسید سدیم ۵ نرمال (سترون شده به روش فیلتراسیون) در ۷-۶/۵ تنظیم کنید.

محیط تهیه شده را با استفاه از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون کنید.

۲- محیط حاوی تریپسین

الف- ترکیبات

کلرید سدیم	۲ گرم
تریپسین	۲/۵ گرم
آب مقطر	تا ۱۰۰۰ میلی‌لیتر

ب- طرز تهیه

مواد فوق را در مقدار مناسبی آب حل کرده، و حجم را به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید و با مقدار مناسب (حدود ۷ میلی لیتر) اسید کلریدریک غلیظ pH آن را در ۲/۳-۲ تنظیم کرده.

محیط مشابهی به عنوان کنترل تهیه کرده و pH آن را با با هیدروکسید سدیم ۵ نرمال (سترون شده به روش فیلتراسیون) در ۷-۶/۵ تنظیم کنید.

محیط تهیه شده را با استفاه از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون کنید.

۶-۶-۳ روش آزمون

از سوسپانسیون میکروبی (طبق بند ۶-۵-۲-۱) به میزان ۲٪ در هر یک از محیط‌های اسید مصنوعی (پپسین و تریپسین) معده (طبق بند ۴-۳-۲-۲) و محیط‌های کنترل تلقیح کرده و در دمای مناسب گرمخانه‌گذاری کنید. در زمان‌های صفر، یک، ۲، ۳، ۴ و ۲۴ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری، یک میلی‌لیتر از هر محیط تلقیح شده برداشته و پس از تهیه رقت‌های مناسب با رقیق کننده آب پپتونه ۰/۱٪ به روش پورپلیت در محیط کشت آگاردار مناسب کشت داده و در زمان و دمای مناسب گرمخانه‌گذاری کنید. تعداد را طبق استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ شمارش کنید. پس از تیمار با شیره معده، تعداد میکروارگانیسمهای زنده نباید کمتر از $۱۰^{۶}$ باشد.

۶-۷ مقاومت به نمک‌های صفراوی (بایل)

۶-۷-۱ اساس روش

اساس روش بررسی مقاومت و میزان کاهش رشد میکروارگانیسم در حضور نمک‌های صفراوی (بایل اگزالات) است.

۶-۷-۲ مواد مورد نیاز

محیط کشت مایع مناسب حاوی ۰/۳٪ بایل اگزالات

محیط کشت را طبق دستور سازنده تهیه و سترون کنید.

۶-۷-۳ روش آزمون

یکصد میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (طبق بند ۶-۵-۲-۱) به محیط کشت مایع حاوی بایل و محیط کشت مایع فاقد بایل (بعنوان بلانک) اضافه کنید. جذب نوری (OD) محیط‌ها را قبل از گرمخانه‌گذاری در طول موج ۶۰۰ تا ۶۵۰ نانومتر اندازه‌گیری کنید.

محیط‌ها را به مدت ۸ ساعت در دما و شرایط مناسب گرمخانه‌گذاری کرده، جذب نوری (OD) محیط‌ها را مجدداً پس از پایان گرمخانه‌گذاری در طول موج ۶۰۰ تا ۶۵۰ نانومتر اندازه‌گیری کنید.

میزان مقاومت میکروارگانیسم نسبت به بایل از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

فرمول ۱

$$Cinh = \frac{(T8 - T0)Control - (T8 - T0)Treatment)}{(T8 - T0)Control}$$

که در آن:

ضریب بازدارندگی	C_{inh}[1]
جذب نوری در محیط کشت بدون بایل، پس از ۸ ساعت گرمخانه‌گذاری	T_8 Control
جذب نوری در محیط کشت بدون بایل، قبل از گرمخانه‌گذاری	T_0 Control
جذب نوری در محیط کشت حاوی بایل، پس از ۸ ساعت گرمخانه‌گذاری	T_8 Treatment
جذب نوری در محیط کشت حاوی بایل، قبل از گرمخانه‌گذاری	T_0 Treatment

ضریب بازدارندگی (C_{inh}) باید مساوی یا کمتر از ۰/۴ باشد.

1- Coefficient of Inhibition (C_{inh})

۶-۸ اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه گوارش

۶-۸-۱ اساس روش

اتصال سویه‌های پروبیوتیک مورد آزمون به یک رده سلولی اپی‌تلیال، بوسیله مجاورت باکتری‌ها با لایه سلولی، در مدت زمان معین بررسی شده و با یک باکتری کنترل که میزان اتصال آن به سلول‌های اپی‌تلیال مشخص است، مقایسه می‌شود. تعداد میکروارگانیسم اتصال یافته به سلول‌های اپی‌تلیال با استفاده از رنگ آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ شمارش می‌شوند.

۶-۸-۲ مواد لازم

۶-۸-۲-۱ محیط کشت جدید (برای اضافه کردن روی چاهک‌ها)

محیط کشت PBS ۶۳ میلی‌لیتر

FBS ۷ میلی‌لیتر

۶-۸-۲-۲ محیط کشت سلول Caco-2

محیط کشت پایه[1] ۱۰۰۰ میلی لیتر

سرم جنین گوساله (FCS)[2] ۱۰۰ میلی لیتر

محلول آمینواسیدهای غیرضروری[3] ۱۰ میلی لیتر

ال- گلوتامین[4] ۱۰ میلی لیتر

پنی‌سیلین (۱۰۰۰۰ واحد/ میلی لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر)[5] ۱۰ میلی لیتر

۶-۸-۳ آماده سازی سوسپانسیون سویه‌های مورد آزمون

برای آزمون چسبندگی از کشت یک شبه[6] باکتری‌ها استفاده کنید. پس از سانتریفوژ کشت و خالی کردن محیط رویی، سلول‌های ته‌نشین شده را با PBS شسته و در محیط کشت سلول سوسپانسیون کنید. غلظت سلول‌ها را با استفاده از استاندارد مک فارلند به ۲×۱۰^{۸} سلول در میلی لیتر برسانید.

از سویه‌های غیر بیماریزای *E.coli* (ATCC 25922) با میزان چسبندگی مشخص بعنوان کنترل استفاده کرده و سوسپانسیونی با همین روش و با غلظت ۲×۱۰^{۸} سلول در میلی لیتر تهیه کنید.

۶-۸-۴ کشت سلول‌ها

یک آمپول از کشت ذخیره نگهداری شده در نیتروژن مایع را در دمای اتاق ذوب کرده، سلول‌ها را سه بار با PBS شسته و در فلاسک‌ها ریخته و محیط کشت بند ۶-۱۲-۲-۲ را به ان افزوده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

1-Minimum Essential Medium (Sigma M 2279)
2-Fetal calf serum (Lablech 4-101-500)
3-Non-essential amino acid solution (Sigma M 7145)
4- L-Glutamine (GIBCO 25030-024)
5-Penicillin 10,000 unit/ml & streptomycin 10,000 µg/ml (GIBCO 15140-122)
6-Overnight cultures

حاوی ۵٪ CO_2 گرمخانه‌گذاری کنید. باید یک روز در میان به سلول‌های کشت داده شده، محیط کشت اضافه شود و هر ۷ تا ۱۰ روز یکبار تجدید کشت شوند.

۶-۸-۵ تهیه کشت برای آزمون

وقتی ۷۰ درصد از لایه سلولی با یکدیگر تلاقی پیدا کردند[1]، محیط کشت را دور ریخته و سلول‌ها را با ۱۰ میلی لیتر PBS شسته و پس از افزودن ۲ میلی لیتر تریپسین- EDTA در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط CO_2 دار به مدت ۲ تا ۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری کنید، تا سلول‌ها از سطح جدا شوند. برای خنثی کردن تریپسین-EDTA، ۲ میلی لیتر محیط کشت اضافه کرده، سلول‌ها را در ۵۰۰۰ دور سانتریفوژ کنید تا تغلیظ شوند و مجدداً در محیط کشت تازه سوسپانسیون کنید تا غلظت سلول‌ها به ۵×۱۰^{۳} سلول در میلی لیتر برسد. سپس حجمی معادل ۱۲/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی تهیه شده را داخل فلاسک کشت سلول بریزید. پس از دومین کشت، می‌توان از سلول‌ها برای آزمون استفاده کرد.

۶-۸-۶ روش آزمون اتصال

بهتر است برای آزمون از پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای استفاده شود. کاور اسلیپ‌های (دایره‌ای با قطر ۱۶ میلی‌متر) سترون شده با اتوکلاو را در ته هر چاهک انداخته، ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی (با غلظت ۵×۱۰^{۳} سلول در میلی لیتر) را در هر چاهک ریخته، پلیت‌ها را در دمای ۳۷ درجه سلسیوس حاوی ۵٪ CO_2 گرمخانه‌گذاری کنید. پس از ۱۳ روز گرمخانه‌گذاری، سلول‌ها برای آزمون آماده هستند.

هنگام آزمون، محیط کشت را از چاهک‌ها برداشته و تک لایه سلولی رشد کرده بر روی کاور اسلیپ‌ها را دو بار با PBS شستشو دهید. ۲ میلی لیتر محیط کشت فاقد آنتی‌بیوتیک به هر چاهک اضافه کرده، و ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (آزمون و کنترل) که حاوی ۲×۱۰^{۸} سلول در میلی لیتر است، به هر چاهک اضافه کنید. آزمون را با دوبار تکرار (برای هر سویه، دو چاهک) انجام دهید. پلیت‌ها را پیش از تثبیت و رنگ‌آمیزی، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس حاوی ۵٪ CO_2 به مدت ۳ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید.

محیط رویی حاوی سلول‌های باکتریایی اتصال نیافته را با استفاده از میکروپیپت برداشته و چاهک‌ها (حاوی کاور اسلیپ) را دو بار با ۲ میلی لیتر PBS شستشو دهید. برای تثبیت سلول‌ها، ۲ میلی لیتر متانول به هر چاهک اضافه کرده، و بلافاصله خالی کنید. مجدداً ۲ میلی لیتر متانول به هر چاهک اضافه کرده، و بگذارید به مدت ۶۰ ثانیه بماند و سپس آن را خارج کنید. کاور اسلیپ‌ها را با گیمسا یا روش گرم رنگ‌آمیزی کنید.

۶-۸-۶-۱ رنگ‌آمیزی گیمسا

مقدار کافی از محلول ۱:۱۰ گیمسا به هر چاهک افزوده، و بگذارید به مدت ۲۰ دقیقه بماند، سپس چاهک‌ها را به ترتیب با ۳ تا ۴ میلی لیتر آب شیر، ۳ تا ۴ میلی لیتر آب اسیدی شده (pH=۳) و مجدداً ۳ تا ۴ میلی لیتر آب شیر بشویید.

1-Confluency

۶-۸-۶-۲ رنگ‌آمیزی گرم

چاهک‌ها را مطابق با استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹ رنگ‌آمیزی کنید.

۶-۸-۷ شمارش باکتری‌های متصل به سلول‌ها

کاور اسلیپ‌های رنگ‌آمیزی شده را از درون چاهک‌ها برداشته، چندین بار (۲۰ بار) در استون و سپس یک محلول رنگ‌زدا (مثل گزیلول) زده و بگذارید خشک شود. طرفی از کاور اسلیپ‌ها را که حاوی سلول‌ها است، بوسیله چسب لام، بر روی لام‌های میکروسکوپ چسبانده، زیر میکروسکوپ (با بزرگنمایی ۱۰۰۰) حداقل ۱۰ زمینه (۱۰۰ سلول از هر لام) را شمارش کنید. تعداد سلول‌ها در هر زمینه و تعداد باکتری‌های متصل به هر سلول را بشمارید.

نسبت اتصال سویه ها به تعداد سلول‌های اپی تلیال شمارش شده، مساوی یا بزرگتر از ۱ باشد.

۶-۹ وجود فلزات سنگین

میزان کل فلزات سنگین (ارسنیک، کادمیوم، آهن، سرب، جیوه و نیکل) در کشت پروبیوتیک باید کمتر از ۱۰ ppm در گرم باشد.

۶-۹ -۱ روش آزمون

طبق استاندارد ملی ایران ۹۲۶۶

۶- ۱۰ آنزیم کاتالاز

۶-۱۰-۱ اساس روش

ایجاد حباب ناشی از فعالیت آنزیم کاتالاز کلنی میکروارگانیسم ایزوله شده بر روی پراکسید هیدروژن بررسی می‌شود.

۶-۱۰-۲ روش آزمون

طبق استاندارد ۹۸۹۹.

۶- ۱۱ هیدرولیز ال - آرژینین

۶- ۱۱-۱ اساس روش

بررسی هیدرولیز آرژینین توسط میکروارگانیسم با کشت در محیط آرژینین دار و تغییر رنگ توسط معرف نسلر انجام می‌شود.

۶- ۱۱-۲ روش آزمون

یک کلنی یا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (طبق بند ۶-۵-۲-۱) را به محیط مایع حاوی ۰/۳٪ اسید آمینه ال- آرژینین منتقل کرده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری کنید. پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت را روی کاغذ صافی حاوی معرف نسلر قرار داده و تغییررنگ را بررسی کنید.

ایجاد رنگ نارنجی متمایل به قرمز نشاندهنده واکنش مثبت است. از *استافیلوکوکوس اورئوس* (25923 ATCC) به عنوان کنترل مثبت استفاده کنید.

۶-۱۲ شمارش کل میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک

تعداد کل میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک که براساس تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی در یک گرم از کشت میکروبی بیان می‌شود، باید با ادعای درج شده روی برچسب یا برگه آنالیز مطابقت داشته باشد.

۷ نشانه‌گذاری

درج اطلاعات زیر بر روی بسته حاوی کشت پروبیوتیک الزامی است:

ادعاهای تغذیه ای و سلامت بخش در صورتیکه مستندات مربوط به آزمایشات کلینیکی مورد تأیید مراجع ذیصلاح قانونی موجود باشد، قابل ذکر خواهد بود، در غیر اینصورت تنها عبارت پروبیوتیک باید ذکر شود.

۷-۱ نام جنس، گونه، سویه یا نام یا کد تجاری

یادآوری- در صورتیکه تنها نام یا کد تجاری بر روی برچسب اعلام شود، باید اطلاعات مربوط به سویه در برگه مشخصات همراه با سویه ارائه شود.

۷- ۲ حداقل میکروارگانیسم‌های زنده در هر گرم از فراورده تا پایان مدت انقضاء؛

۷-۳ نوع فراورده براساس روش تولید (لیوفیلیزه، خشک شده پاششی، مایع)؛

۷-۴ شرایط نگهداری؛

۷-۵ تاریخ تولید و انقضاء (روز، ماه، سال)؛

۷-۶ نام و مشخصات تولید کننده؛

۷-۷ شماره بهر تولید؛

۷-۸ سایر اطلاعات شامل موارد زیر باید در برگه اطلاعات فنی همراه سویه ارائه شود.

۸- برگه اطلاعات فنی

هر سویه ارائه شده بایستی دارای برگه اطلاعات فنی شامل موارد زیر باشد:

۸-۱ موارد مصرف؛

۸-۲ دستورالعمل استفاده (میزان تلقیح، دمای گرمخانه‌گذاری)؛

۸-۳ نتایج کلیه آزمایش‌هایی که طبق این استاندارد بر روی سویه انجام شده است؛

۸-۴ نتایج آزمایش‌های بالینی اثبات کننده ادعاهای تغذیه‌ای؛

۸-۵ مجوزهای بهداشتی سازمان غذا و دارو.

پیوست الف

(اطلاعاتی)

اثبات ادعاهای سلامت‌بخش

باید ادعای سلامت بخش بودن سویه با روش‌های برون تن[1] و درون تن[2] اثبات شده و مستندات لازم ارائه شود.

الف-۱ فعالیت ضد میکروبی

این آزمون در صورتیکه سویه مورد نظر ادعای ضدمیکروبی داشته باشد، باید انجام شود.

الف -۱-۱ اساس روش

توانایی سویه‌های جدا شده در تولید ترکیبات ضد میکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زای استاندارد، با تلقیح میکروارگانیسم‌های بیماریزا در یک آگار نرم و افزودن آن بعنوان لایه رویی به یک محیط کشت آگاردار مناسب حاوی تعداد مشخصی از میکروارگانیسم پروبیوتیک و بررسی وجود هاله شفاف ناشی از ممانعت از رشد لایه آگار نرم حاوی میکروارگانیسم بیماریزا سنجیده می‌شود.

ب-۱-۱ روش نقطه‌ای[3]

از سوسپانسیون ۲۰ ساعته سویه پروبیوتیک در محیط کشت مایع مناسب، ۲ میکرولیتر که حاوی $۱۰^{۶}$ میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر باشد، را بصورت نقطه‌ای بر سطح پلیتی با قطر ۸ تا ۱۰ سانتی متر، حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت آگاردار مناسب که سطح آن خوب خشک شده باشد، قرار دهید.

یادآوری – پلیت‌ها باید حداقل به مدت ۳۰ دقیقه در هوای اتاق خشک شوند، تا نقاط تلقیح شده، پخش نشوند.

پلیت‌های تلقیح شده را به مدت ۲۴ ساعت در شرایط مناسب گرمخانه‌گذاری کنید.

برای تهیه لایه حاوی میکروارگانیسم بیماریزای مورد ادعا، از سوسپانسیون میکروبی حاوی $۱۰^{۶}$ میکروارگانیسم بیماریزا در حجم مناسب محیط کشت آگاردار نرم (حاوی ۰/۷٪ وزنی به حجمی آگار) ذوب شده که دمای آن به ۴۵ درجه سلسیوس رسیده باشد، اضافه کنید تا درصد سوسپانسیون میکروبی در آگار به ۱درصد حجم به حجم برسد. برای تهیه لایه دوم، ۱۰ میلی‌لیتر از این محیط را به هر پلیت اضافه کنید.

یادآوری- برخی از میکروارگانیسم‌های بیماریزایی که پروبیوتیک‌ها علیه آنها فعالیت ضدمیکروبی دارند، شامل موارد زیر هستند:

استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا تیفی‌موریوم، کاندیدا آلبیکنس.

پلیت‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در شرایط مناسب گرمخانه‌گذاری کرده، پس از مدت زمان گرمخانه‌گذاری، قطر هاله ایجاد شده را با خط‌کش میلیمتری اندازه‌گیری کنید.

1- In Vitro
2- In Vivo
3- Spot test

وجود هاله عدم رشد، با قطر بیش از ۲ میلی متر را بعنوان اثر ضدمیکروبی علیه میکروارگانیسم بیماریزای مورد ادعا گزارش کنید.
در گزارش آزمون، باید نام و منبع سویه بیماریزا اعلام شود. استفاده از سویه‌های ثبت شده در کلکسیون‌های میکروبی معتبر، ارجحیت دارد.

الف -۲ کاهش کلسترول

در صورتیکه سویه مورد نظر اعای کاهش کلسترول داشته باشد، باید این آزمون انجام شود.

الف -۲-۱ اساس روش:

اساس این روش براساس هیدرولیز اسیدهای صفراوی توسط میکروارگانیسم در محیط کشت حاوی کلسترول اگزالات است.

الف -۲-۲ مواد مورد نیاز

- کشت یکروزه در محیط مایع مناسب
- محیط کشت مایع مناسب حاوی کلسترول که با افزودن ۳ گرم بایل اکس گال (Bile Oxgall) به محیط کشت مایع اضافه کرده و طبق توصیه سازنده (در اتوکلاو) سترون کنید. سپس ۱٪ (حجم/حجم) لیپید غنی از کلسترول (Sigma, L-4646) به آن افزوده و در ۴ درجه سلسیوس نگهداری کنید.

یادآوری ۱- در صورت عدم توصیه سازنده در اتوکلاو در ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه، سترون کنید.

یادآوری ۲- لیپید غنی از کلسترول سترون است و در زمان مصرف به محیط افزوده می‌شود. از حرارت دادن به لیپید خودداری نمایید.

- اتانول ۹۵٪: در هنگام مصرف آماده شود و یا در ۴ درجه نگهداری شود.
- پتاسیم هیدروکساید ۵۰٪، در دمای اتاق ماندگار است.
- هگزان خالص، در ۴ درجه نگهداری شود.
- آب مقطر
- گاز نیتروژن
- معرف O- فتال آلدئید: این معرف شامل ۰/۵ میلی گرم O- فتال آلدئید (sigma) در هر میلی لیتر از اسیداستیک است و در هنگام مصرف آماده می‌شود.
- سولفوریک اسید غلیظ

الف -۲-۳ روش آزمون

۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروارگانیسم (طبق بند ۶-۵-۲-۱) در محیط مایع مناسب، به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی کلسترول اگزالات تلقیح کنید و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ساعت گرمخانه‌گذاری

کنید. تمام مراحل آزمون با استفاده از یک محیط کشت حاوی کلسترول اگزالات بدون تلقیح میکروارگانیسم (به عنوان بلانک) انجام می‌شود. پس از مدت زمان گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها را در g۸۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کرده و ۰/۵ میلی لیتر از مایع رویی را در لوله‌های شیشه‌ای جداگانه بریزید. به هر لوله ۳ میلی لیتر اتانول ۹۵٪ اضافه کرده، سپس ۲ میلی‌لیتر پتاسیم هیدروکساید ۵۰٪ اضافه کنید و پس از افزودن هر ماده، ترکیب را مخلوط کنید.

لوله‌ها را در حمام آب ۶۰ درجه به مدت ۱۰دقیقه حرارت داده و سپس در دمای اتاق خنک کنید. به هر لوله به آرامی ۵ میلی لیتر هگزان افزوده، به مدت ۲۰ ثانیه با شدت مخلوط کنید. سپس به آنها ۳ میلی لیتر آب مقطر افزوده و با ورتکس مخلوط کردن را ادامه دهید. لوله‌ها را در دمای اتاق به مدت ۱۵دقیقه یا تا زمانی که تفکیک کامل فاز (فاز آبی و فاز آلی) انجام شود، به حال خود بگذارید.

۲/۵ میلی لیتر از لایه هگزان (فاز بالایی) را در یک لوله تمیز ریخته، و هگزان را در ۶۰ درجه و تحت اثر گاز نیتروژن تبخیر کنید. مایع باقی‌مانده در لوله‌ها را با ۴ میلی لیتر معرف o- فتال آلدئید مخلوط کرده، و در دمای اتاق به مدت ۱۰دقیقه نگه دارید. سپس به آهستگی ۲ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ به هر لوله افزوده و آنها را مخلوط کنید.

پس از ۱۰دقیقه استراحت، جذب نوری نمونه‌ها را در ۵۵۰ نانومتر در مقابل بلانک بخوانید. کاهش کلسترول توسط میکروارگانیسم با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود. نتایج بر حسب میکروگرم کلسترول در هر میلی‌لیتر بیان می‌شود.

فرمول الف- ۱: مقدار کلسترول باقیمانده در محیط کشت

$$M1 = \frac{ODs\ M}{ODs\ C}$$

فرمول الف- ۲:

$$X = M0 - M1$$

که در آن:

جذب نوری نمونه	OD_s
جذب نوری کنترل	OD_c
مقدار کلسترول اضافه شده به محیط کشت	M_0
مقدار کلسترول باقیمانده در محیط کشت (طبق فرمول ۱)	M_1

یادآوری- می‌توان برای تعیین میزان کاهش کلسترول، جذب نوری محیط حاوی میکروارگانیسم را با منحنی استاندارد (محیط بدون میکروارگانیسم) مقایسه شود. برای بدست آوردن منحنی استاندارد همه مراحل بالا بر روی غلظت‌های مختلف کلسترول (شامل ۰ و ۱۰ و ۲۰ و ۳۰ و ۴۰ و ۵۰ و ۶۰ و ۷۰ و ۸۰ و ۹۰ و ۱۰۰ میکروگرم) باید انجام شود.

الف -۲-۴ فعالیت هیدرولازی نمک‌های صفراوی (روش آزمون کیفی)

در صورتیکه سویه مورد نظر ادعای هیدورلیز نمک‌های صفراوی داشته باشد، باید این آزمون انجام شود. آزمون به دو روش کیفی و کمّی انجام می‌شود.

الف -۲-۴ -۱ اساس روش

این آزمون با استفاده از سوسپانسیون میکروارگانیسم (طبق بند ۶-۵-۲-۱) بر روی محیط کشت حاوی نمک سدیم اسیدهای صفراوی و ایجاد رسوب دزوکسی کولیک اسید در اطراف کلنی انجام می‌شود.

الف -۲-۴ -۲ مواد مورد نیاز (مقادیر برای ۱ لیتر)

- محیط کشت آگاردار مناسب بدون نمک صفراوی (به عنوان کنترل)
- محیط کشت آگاردار مناسب (حاوی نمک‌های صفراوی) که به آن ۵ گرم از نمک سدیم یکی از اسیدهای صفراوی زیر افزوده می‌شود.

تاوروکولیک اسید[۱](TCA)،

گلیکوکولیک اسید[۲](GCA)،

تاورودئوکسیکولیک اسید[۳] (TDCA)،

گلیکودئوکسیکولیک اسید[۴] GDCA.

در همه این موارد غلظت نهایی اسید کونژوگه حدود mM ۴ می‌باشد.

در صورتی‌که میکروارگانیسم بیهوازی یا میکروآئروفیل باشد، بهتر است به محیط کشت ۵ گرم تیوگلیکولات افزوده شود.

محیط‌های کشت را طبق توصیه سازنده سترون کنید.

یادآوری- در صورت عدم توصیه سازنده در اتوکلاو در ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه، سترون کنید.

الف -۲-۴ -۳ روش آزمون

محیط‌های کشت آگاردار را ذوب کرده و جداگانه در پلیت‌های سترون بریزید و پس از بستن آگار بصورت وارونه حداقل به مدت ۴۸ساعت قبل از مصرف در شرایط مناسب نگهداری کنید.

ده میکرولیتر از سوسپانسیون میکروارگانیسم (طبق بند ۶-۵-۲-۱) را روی سطح پلیت‌ها کشت سطحی داده و در دما و زمان و شرایط مناسب گرمخانه‌گذاری کنید.

هیدرولیز نمک‌های صفراوی با ایجاد یک رسوب سفید در اطراف کلنی‌های رشد یافته قابل تشخیص است، که در محیط کشت کنترل (بدون نمک‌های صفراوی) مشاهده نمی‌شود.

1- Taurocholic acid, Sodium salt (C26H44NNaO7S, MW :537.68483)

2- Glycocholic acid, Sodium salt (C26H42NNaO6, MW: 489.62)

3-Deoxycholic acid, Sodium salt (Sodium Deoxycholate)

4- Glycodeoxycholate acid, Sodim salt (C26H42NNaO5, MW:471.61)

یادآوری ۱- برای باکتری‌های بی‌هوازی و میکروآئروفیل، محیط‌های کشت مایع یا آگاردار باید در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شوند. می‌توان از تیوگلیکولات سدیم[1] یا سیستئین کلرهیدرات[2] برای پایین آوردن پتانسیل احیا استفاده کرد.

یادآوری ۲- TDCA و GDCA هاله‌های قوی‌تری ایجاد می‌کنند، بطوریکه رسوب سفید و هاله‌های پراکنده در اطراف کلنی‌ها به وضوح مشاهده می‌شود، در حالیکه TCA و GCA تأثیر کمتری دارند. همچنین سویه‌هایی که قابلیت بالای فعالیت هیدرولیزی نمک‌های صفراوی TDCA و GDCA را دارند، غلظت بالایی از دزوکسی کولیک اسید آزاد می‌کنند که گاهی باعث مهار رشد در پلیت می‌شود. در این موارد استفاده از غلظت‌های پایین‌تر TDCA و GDCA (۲mM) پیشنهاد می‌شود.

1-Sodium thioglycolate (C2H3NaO2S, MW:114.1)
2-Cysteine chlorhydrate (C3H8ClNO2S, MW 157.62)

پیوست ب

(اطلاعاتی)

کتاب‌نامه

1. Heidarpour, M., Mokhtari F., Heidarzadeh, M., Safety and properties of Bifidobacteria isolated from traditional dairy products from Iran, 2013, Iranian Journal of Microbiology, Vol 5, N 3.
2. John F. T. Spencer And Alicia L. Ragout de Spencer, 2001, Food Microbiology
3. Protocols, Methods in Biotechnology ™, Humana Press Inc.
4. Sampo J. Lahtinen, Robert J. Boyle, Abelardo Margolles, Rafael Frias, 31- Safety Assessment of Probiotics, in Prebiotics and Probiotics Science and Technology, 2009, Springer Science+Business Media, LLC
5. Klayraung S., Viernstein H., Sirithunyalug J., Okonogi S., 2008, Probiotic Properties of Lactobacilli Isolated from Thai Traditional Food, Sci Pharm.; 76: 485–503
6. Borriello S.P., Hammes W. P, W. Holzapfel, P. Marteau, J. Schrezenmeir, M. Vaara, and Valtonen V., 2003 Safety of Probiotics that Contain Lactobacilli or Bifidobacteria, CID 36:775-780.
7. Yanyan Wang; Heping Zhang,; Lei Zhang,; Wenjun Liu,; Yong Zhang,; Xinchang Zhang, Tiansong, 2010, In vitro assessment of probiotic properties of Bacillus isolated from naturally fermented congee from Inner Mongolia of China,World Journal of Microbiology and Biotechnology , 26:1369-1377.
8. Valdez Graciela Font de and Taranto Maria Pia, Chapter 21, Probiotic Properties of Lactobacilli, Cholesterol Reduction and Bile Salt Hydrolase Activity, in Methods in Biotechnology, Food Microbiology Protocols, John F. T. Spencer and Alicia L. Ragout de Spencer, 2001 Humana Press Inc.