نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ۲۴، پاییز ۱۳۹۶
ص‌ص: ۱۵~۲۲

# بررسی تاثیر فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک با فرم کوکسی جدا شده از نمونه‌های شیر شتر بر کاهش حساسیت‌زایی پروتئین‌های کازئین شیر گاو

- **ریحانه کردسدهی** (نویسنده مسئول)
دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی گرایش میکروبی، دانشگاه اصفهان.
- **محمد ربانی‌خوراسگانی**
دانشیار بخش میکروب‌شناسی،گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان.
- **اصغر طاهری کفرانی**
استادیار گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان.

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۳۱۳۷۹۳۲۴۶۹

Email: m.rabbani@biol.ui.ac.ir

**چکیده**

**حساسیت به شیر گاو حدود ۷/۵-۲ درصد از جمعیت کودکان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. کازئین‌های شیر گاو نقش اساسی را در آلرژی پایدار ایفا می‌کنند. سیستم‌های پروتئولیتیک باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از شیرهای خام مخصوصا شیر شتر توانایی هیدرولیز اپی‌توپ‌های حساسیت‌زا را داشته و بنابراین می‌توانند منجر به کاهش آلرژی‌زایی پروتئین‌های شیر گاو از جمله کازئین‌ها شوند. در این پژوهش پس از جداسازی سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک با فرم کوکسی از نمونه‌های شیر شتر تک‌کوهانه، فعالیت پروتئولیزی آن‌ها بر روی هیدرولیز پروتئین‌های کازئین ارزیابی شد. تاثیر فعالیت پروتئولیتیکی این باکتری‌ها بر روی کازئین شیر گاو توسط روش‌های الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید و کروماتوگرافی فاز معکوس بررسی شد. کاهش میزان حساسیت‌زایی پروتئین‌ها توسط بهترین سویه‌های پروتئولیتیک توسط آزمون الایزای رقابتی تایید شد. نتایج نشان دادند که آنزیم‌های پروتئیناز تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از شیر شتر فعالیت پروتئولیتیک قوی علیه کازئین‌های شیر گاو دارند. آلفاکازئین هیدرولیز شده نیز نسبت به نوع طبیعی به میزان کمتری توسط IgE سرم بیماران دارای حساسیت به شیر گاو تشخیص داده شده که نشان دهنده‌ی کاهش آلرژی‌زایی این پروتئین می‌باشد.**

**واژه‌های کلیدی:** باکتری اسید لاکتیک، پروتئین‌های کازئین، حساسیت به شیر گاو، ، سیستم پروتئولیتیک. کروماتوگرافی مایع فاز معکوس

Applied Animal Science Research Journal No 24 pp: 15-22

**Investigation the Effect of Proteolytic Activity of Cocci form Lactic Acid Bacteria Isolated from One-Humped Camel Milk Samples on Reduction of Cow Milk Casein Proteins Allergenicity**

By*:* R.Kordesedehi[1], M. Rabbani Khorasgani [2]*, A.Taheri kafrani[3]
1: Msc Student of Biotechnology Microbe. Isfahan University, Isfahan, IRAN.
2: Associate Professor, Department of Biology, University of Isfahan, Isfahan, IRAN.
3: Professor, Department of Biotechnology, Isfahan University, Isfahan, IRAN

Bovine milk allergy concerns about 2-7/5% of children population. Cow's milk proteins are the firs source of antigens encouraged in large quantities in infancy. Cow's milk caseins play a basic role in persistent of cow's milk allergy (CMA) in children. The proteolytic systems of LAB isolated of raw milks especially camel milk have the ability to hydrolyze antigenic epitopes and as a result can reduce allergy to milk proteins such as caseins. In this study after the isolation of *cocci* LAB from raw camel milk samples their proteolytic activity on caseinate hydrolysis were investigated. The effects of proteolytic activity of these bacteria on milk caseins were investigated using SDS-PAGE and RP-HPLC techniques. Residual antigenicity of these proteins was determined by competitive ELISA test. Results demonstrated that the proteinases produced by camel milk LAB strains had strong activity against Na-caseinate. Hydrolysated $\alpha_{S1}$-casein was less recognized than the native one by IgE from cow's milk allergic patients sera indicating reduces in the allergenicity properties of this protein.

**Key words:** Bovine milk allergenicity, Casein proteins, Lactic acid bacteria, Proteolytic systems, Reverse Phase-HPLC

**مقدمه**

حدود ۸ درصد کودکان زیر سه سال کشورهای توسعه‌یافته به شیر گاو حساسیت دارند. این حساسیت می‌تواند ناشی از واکنش به یکی از پروتئین‌های موجود در شیر گاو باشد. پروتئین‌های کازئینی مهم‌ترین حساسیت‌زاهای شیر هستند و رابطه‌ای معنی‌داری بین بروز علائم تنفسی، پوستی و حساسیت به این پروتئین‌ها وجود دارد (El-Agamy, 2007). علائم حساسیت در بیماران به‌حالت تنفسی، پوستی، گوارشی و شوک آنافیلاکسی ظاهر می‌شود (Wal, 2004). شواهد نشان می‌دهند که شیر گاو اصلی‌ترین عامل بروز شوک‌های آنافیلاکسی در میان کودکان ایرانی است (Barzegar, *et al.*, 2010). $\alpha s_1$–کازئین یکی از اصلی‌ترین پروتئین‌های مسئول حساسیت به شیر گاو می‌باشد. این پروتئین از خانواده فسفوپروتئین‌ها بوده و میزان بالایی از دنباله‌های پرولینی در سرتاسر این مولکول توزیع شده است. تعداد بسیار اندک پیوندهای دی‌سولفیدی منجر به کاهش پایداری ساختاری این پروتئین می‌شود. این عوامل شانس بیشتر بودن اپی-توپ‌های خطی نسبت به فضایی به‌عنوان اپی‌توپ حساسیت‌زای اصلی در $\alpha s_1$–کازئین را افزایش می‌دهد (Restani, *et al.*, 2009). تغییر و تخریب این اپی‌توپ‌ها می‌تواند منجر به کاهش شناسایی پروتئین توسط آنتی‌بادی‌های موجود در سرم افراد شود (Tsabouri, Douros and Priftis, 2014; Dalgleish and Corredig, 2014). مطالعات و روش‌های مختلفی برای کاهش حساسیت‌زایی پروتئین‌های شیر از جمله کازئین‌ها انجام شده است. فعالیت‌های حرارتی، فرآوری غذایی غیرحرارتی مانند به‌کارگیری اشعه ماوراء بنفش، فراصوت با شدت

بالا و یا ترکیبی از روش‌های مختلف قنددار کردن و دادن حرارت از این موارد هستند. ولی این روش‌ها تاکنون به‌طور کامل مؤثر واقع نشده‌اند (Crawford, 1960).

در این بین استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک نقش موثرتری به خود اختصاص داده‌اند (El-Ghaish, Rabesona, *et al.*, 2011). این باکتری‌ها با منشاءطبیعی محصولات لبنی و با فواید فراوان برای سلامتی انسان، جایگاه ویژه‌ای دارند. در صنعت لبنیات از سویه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک برای تخمیر و فرآوری محصولات لبنی استفاده می‌شود. نقش تخمیر درکاهش حساسیت‌زایی محصولات اثبات شده است (Terzic-Vidojevic Tolinacki, *et al.*, 2009). باکتری‌های اسید لاکتیک از جمله معروف‌ترین و فراوان‌ترین باکتری‌های پروبیوتیکی بوده که به‌علت تولید پروتئازهای متصل به غشاء قادر به تجزیه پروتئین‌های محصولات لبنی هستند. سیستم ناقل پپتیدی، پروتئازها و پپتیدازهای این باکتری‌ها، اسیدآمینه‌های مورد نیاز برای رشد این باکتری‌ها را تامین می‌کند (۵). از طرفی این فرآیند فواید بسیار دیگری هم دارد، از جمله این‌که با شکسته شدن این پروتئین‌ها، محصولات متنوع با طعم و بوی مطبوع تولید شده و فرآیند هضم برای انسان را آسان‌تر می‌کنند که این به‌نوبه خود می‌تواند موجب کاهش حساسیت‌زایی پروتئین‌های این محصولات شود (Isolauri, *et al.*, 1995). در کودکان به‌علت هضم ضعیف پروتئین‌های شیر، پروتئولیز می‌تواند با کاهش تعداد اپی‌توپ‌ها و در نتیجه کاهش حساسیت‌زایی در پروتئین هیدرولیز شده از بروز مشکلات حساسیتی جلوگیری کند.

در سال ۲۰۰۹، ترزیک ویدوژویک و همکاران، باکتری‌های اسید لاکتیک را از محصولات لبنی آذربایجان جدا کرده و فنوتیپ و ژنوتیپ آن‌ها را بررسی نمودند. از این میان دو جدایه *انتروکوکوس فکالیس*[1] HH22 و *انتروکوکوس فسیوم*[2] DO623 بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی را داشتند (Terzic-Vidojevic, *et al.*, 2009). میزان اتصال آنتی‌بادی IgE به پروتئین‌های آلفاکازئین و بتاکازئین پس از فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*[3] IFO 3956 و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*[4] A75 کاهش پیدا می‌کند (El-Ghaish, Ahmadova-Hadji-Sfaxi, *et al.*, 2011; Ahmadova, *et al.*, 2013).

در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۱۳، شی و همکاران نشان دادند که تخمیر شیر بدون چربی توسط باکتری *Lactobacillus casei* N115 می‌تواند آلرژی‌زایی را در پروتئین‌های اصلی شیر از جمله آلفاکازئین و بتاکازئین به میزان قابل‌توجهی پس از ۲۸ ساعت تخمیر کاهش دهد (Shi, *et al.*, 2014).

از آن‌جایی که باکتری‌های اسید لاکتیک‌کوکسی شکل به‌عنوان اصلی‌ترین استارترها در تولید محصولات لبنی تخمیری استفاده می‌شوند، شیر حیوانات اهلی یکی از منابع تامین‌کننده خانواده بزرگ باکتری‌های اسیدلاکتیک بوده و شیر شتر نیز از منابع ارزشمند در این زمینه می‌باشند. هدف این پژوهش، جداسازی سویه‌های باکتری اسیدلاکتیک با فرم کوکسی است که به‌صورت طبیعی در نمونه‌های شیر شتر موجود می‌باشند و با داشتن خاصیت پروتئولیزی بر روی پروتئین‌های کازئین شیر گاو، پتانسیل خوبی در کاهش حساسیت زایی پروتئین آلفاکازئین دارند.

## مواد و روش‌ها

### آماده‌سازی و کشت اولیه‌ی باکتری‌ها در محیط MRS[5]

پس از جمع‌آوری نمونه‌های شیر شتر تک‌کوهانه، کشت نمونه-های شیر بر روی محیط کشت اختصاصی MRS آگاردار انجام شد. کشت نمونه‌ها با انتقال مستقیم نمونه‌ها توسط لوپ بر روی محیط کشت آگاردار و با روش کشت خطی چهار منطقه‌ای انجام شد. بعد از کشت، پلیت‌ها در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ روز در شرایط هوازی و بی‌هوازی با استفاده از دسیکاتور گرمخانه‌گذاری شدند. پس از این مدت، کلنی‌های ظاهر شده بر روی پلیت‌ها با رنگ‌آمیزی گرم ارزیابی شدند. سپس کلنی مربوط به باکتری‌های کوکسی شکل مورد آزمایش کاتالاز

[1] *Enterococcus faecalis*
[2] *Enterococcus faecium*
[3] *Lactobacillus fermentum*
[4] *Lactobacillus helveticus*
[5] De man, rogosa and sharpe agar (MRS)

قرار گرفت و کلنی‌های کاتالاز منفی با خصوصیات ظاهری متفاوت مانند رنگ، ظاهر، شکل و اندازه که به تعداد ۱۵ کلنی بودند برداشت و با کشت‌های متوالی خطی خالص‌سازی شدند.

جهت حفظ و نگه‌داری باکتری‌ها در این پژوهش از روش‌های تهیه‌ی ذخیره گلیسرول استفاده شد. در روش تهیه‌ی ذخیره گلیسرول، در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل، میزان۶۵۰ میکرولیتر نمونه‌ی باکتری تغلیظ شده در MRS-براث[6] و ۳۵۰ میکرولیتر گلیسرول ۸۵ درصد استریل ریخته شد. بعد از پایان کار، درب ویال‌ها با استفاده از پارافیلم محکم شده و به مدت یک تا سه روز در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس ویال‌ها به فریزر ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

## بررسی فعالیت پروتئولیتیکی سویه‌های جدا شده از شیر شتر توسط روش‌های SDS-PAGE و RP-HPLC

### کشت بر روی محیط شیر سیترات آگار[7]

پس از رشد باکتری‌ها در محیط MRS مایع، برای تحریک باکتری‌ها جهت تولید پروتئاز و بررسی اثر پروتئولیزی، باکتری‌ها از این محیط به محیط شیر- سیترات آگار منتقل و به صورت چمنی کشت داده شدند. پس از ۴۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سلسیوس،کلنی‌های باکتری در سطح محیط رشد کردند. پس از رشد باکتری‌ها، محیط کشت رنگ شفاف خود را از دست داده و رنگ کدر (شیری یا سفید) به خود می‌گیرد. برای محاسبه جمعیت باکتریایی از اندازه‌گیری جذب نوری استفاده شد. جذب نوری باکتری در بافر فسفات در طول موج ۶۰۰ نانومتر، بایستی عددی بین ۳۰-۲۰ باشد. سپس جمعیت مناسب باکتریایی با نسبت یکسان با پروتئین سدیم‌کازئینات طبیعی جهت فرآیند هیدرولیز انکوبه شده و در نهایت از دو تکنیک الکتروفورز ژل آگارز و کروماتوگرافی فاز معکوس جهت بررسی فعالیت پروتئازی باکتری‌ها استفاده شد. بررسی اولیه و کیفی فعالیت پروتئولیزی و اثر پروتئازهای باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از نمونه‌های شیر شتر بر پروتئین‌های کازئین شیر گاو توسط روش SDS-PAGE در شرایط کاهشی صورت گرفت. سپس به‌منظور بررسی دقیق‌تر و کمی اثر باکتری‌های هیدرولیز کننده بر پروتئین‌های کازئین شیر گاو از روش کروماتوگرافی فاز معکوس استفاده شد.

## بررسی میزان کاهش حساسیت‌زایی پروتئین کازئینات به وسیله آزمون الایزای رقابتی

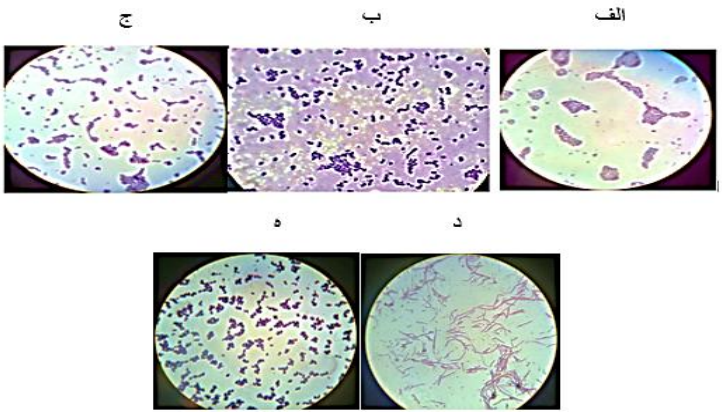
آزمایش‌های الایزای رقابتی با استفاده از کل پروتئین‌های کازئین انجام شده است اما آن‌چه که مربوط به پیوند شدن به IgE است پروتئین آلرژی‌زای $\alpha s_1$ - کازئین می‌باشد. در این مطالعه، پیوند شدن IgE افراد بیمار دارای حساسیت به شیر گاو به $\alpha s_1$ - کازئین طبیعی و هیدرولیز شده، با استفاده از روش الایزای رقابتی جهت بررسی حساسیت‌زایی انجام گرفت. با این هدف مخلوطی از سرم بیماران دارای حساسیت به شیر گاو جهت بررسی حساسیت-زایی $\alpha s_1$-کازئین هیدرولیز شده نسبت به پروتئین طبیعی استفاده گردید. برای بررسی رقابت بین پروتئین طبیعی و هیدرولیزات، داده‌های حاصل از الایزاخوان به‌صورت یک منحنی دوز-پاسخ رسم شد. در این منحنی‌های دوز-پاسخ، عموماً ارتباط غیرخطی (سیگموئیدی) بین پاسخ و میزان مهارکننده نمایش داده می‌شود.

[6] MRS broth
[7] Citrate Agar

## نتایج و بحث

### نتایج حاصل از کشت و جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک

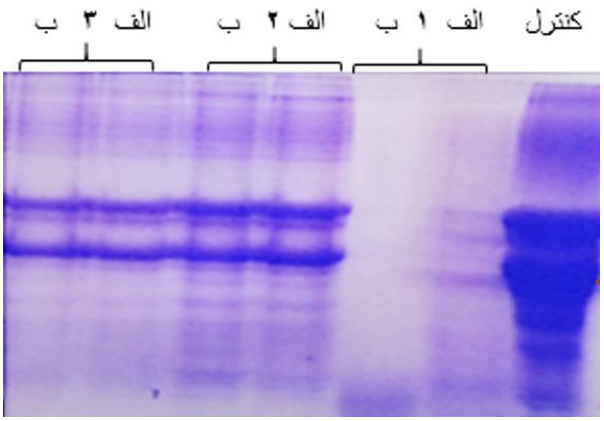
سویه‌های خالص‌سازی شده به شکل‌های مختلف از جمله کوکسی و باسیل بودند. لازم به ذکر است که در میان نمونه‌های شیر شتر، مخمرها و لاکتوباسیلوس‌ها نیز جدا شده که نمونه‌های مخمر برخلاف باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده کاتالاز مثبت می‌باشند. در نهایت از این ۵ نمونه‌های شیر شتر تهیه شده، در کل ۱۵ نمونه کلنی باکتری کاتالاز منفی با شکل‌های کوکسی و کوکوباسیل جدا شد و برای انجام آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند. از کلنی‌های سفید و کرم رنگ کاتالاز منفی با شکل کوکسی به‌دست آمده، تک‌کلنی‌های مرتبط با یک سوش باکتریایی توسط سه تا پنج مرتبه کشت‌های متوالی خطی بر روی محیط MRS-آگار خالص‌سازی شدند. در شکل ۱ تصویر میکروسکوپی سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک با شکل کوکسی جدا شده از نمونه‌های شیر شتر نشان داده شده است.




شکل ۱- تصویر میکروسکوپی سویه‌های جدا شده از نمونه‌های شیر شتر ایرانی که توسط رنگ‌آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر تهیه شده‌اند.

نمونه‌های (الف تا ج): سویه‌های باکتری با فرم‌های کوکسی جدا شده از نمونه‌های شیر شتر، (د): نمونه‌ای از سویه‌های لاکتوباسیلوس‌های جدا شده و (ه) نمونه‌ای از تصویر میکروسکوپی مخمر نمونه‌های شیر.

کاهش تراکم باندها در ژل الکتروفورز، نشان‌دهنده‌ی هیدرولیز توسط پروتئازهای باکتریایی می‌باشد. نتایج حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های کازئین شیر گاو، پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی و با نمونه کنترل که پروتئین‌های کازئین شیر گاو بدون حضور پروتئاز باکتریایی می‌باشد، مقایسه شد. شکل۲ مربوط به نتایج-SDS PAGE و بررسی اثر پروتئولیتیکی سویه‌های اسید لاکتیک با فرم کوکسی جدا شده از شیر شتر می‌باشند که به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت با پروتئین‌های کازئین شیر گاو انکوبه شدند. همان‌گونه که در تصاویر مشخص است، سویه باکتری‌های جدا شده از شیر شتر دارای بهترین فعالیت هیدرولیزی بر پروتئین‌های کازئین شیر گاو بوده و پهنای باند مربوط به کازئین‌ها را به‌صورت محسوسی کاهش دادند. فعالیت پروتئولیزی این سویه بر روی پروتئین‌های کازئین شیر گاو در نهایت توسط کروماتوگرافی فاز معکوس تایید نهایی شد.



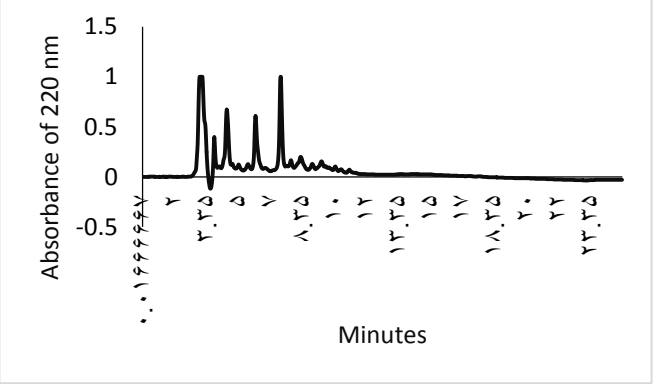

شکل ۲- نتایج SDS-PAGE کاهشی ۱۲ درصد حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های کازئین شیر گاو، توسط باکتری‌های کوکسی‌اسیدلاکتیک جدا شده از نمونه‌های شیر شتر بومی ایران.

ستون اول مربوط به پروتئین‌های کازئین شیر گاو به‌عنوان نشان‌گر می‌باشد. این باکتری‌ها به‌مدت (الف) ۲۴ و (ب) ۴۸ ساعت با پروتئین‌های کازئین شیر گاو انکوبه شده تا میزان اثر آن‌ها بر این پروتئین در ژل الکتروفورز نمایان شود. نمونه ۱ مربوط به سویه جدا شده از نمونه شیر شتر با بهترین فعالیت پروتئولیتیکی پس از

گذشت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت می‌باشد. نمونه‌های ۲ و ۳ مربوط به دیگر باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از شیر شتر با فعالیت پروتئولیتیکی کم‌تر می‌باشند که هر کدام در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت با پروتئین سدیم کازئینات شیر گاو انکوبه شدند.

## نتیجه کروماتوگرافی فاز معکوس حاصل از هیدرولیز باکتریایی پروتئین‌های کازئین شیر گاو توسط باکتری اسیدلاکتیک جدا شده از شیر شتر با بهترین فعالیت پروتئولیتیکی

در روش کروماتوگرافی، فاز معکوس ستون به‌صورت غیرقطبی (آب‌گریز) می‌باشد و پپتیدهای حاصل از هیدرولیز باکتریایی، براساس میزان آب‌گریز بودن خود به ستون متصل می‌شوند نمودار هیدرولیزات حاصل از تاثیر سویه جدا شده از شیر شتر پس از گذشت زمان ۲۴ ساعت هیدرولیز مناسب و ایجاد تغییرات اساسی در ساختار پروتئین‌های کازئین شیر گاو را نشان می‌دهد که در شکل ۳ به تصویر کشیده شده است.




شکل ۳- نمودار کروماتوگرافی فاز معکوس پروتئین‌های کازئین شیر گاو هیدرولیز شده توسط باکتری کوکسی‌اسیدلاکتیک جدا شده از نمونه شیر شتر با بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی

## نتایج آزمون الایزای رقابتی بر روی پروتئین $\alpha s_1$ - کازئین هیدرولیز شده و طبیعی توسط سویه پروتئولیتیک

داده‌های حاصل از آزمون الایزای رقابتی و مقایسه مقادیر $IC_{50}$ پروتئین آلفا کازئین طبیعی با پروتئین هیدرولیز شده توسط سویه پروتئولیتیک جدا شده از شیر شتر نشان دادند که $\alpha s_1$ -کازئین هیدرولیزات به مقدار کمتری نسبت به پروتئین طبیعی توسط IgE موجود در سرم بیماران دارای حساسیت به شیر گاو تشخیص داده می‌شود. در واقع IgE در غلظت‌های بالاتری از پروتئین هیدرولیزات در مقایسه با پروتئین طبیعی قادر به شناسایی و واکنش نسبت به آن است. این امر کاهش حساسیت به $\alpha s_1$ -کازئین که پروتئینی مقاوم در برابر شکست ساختار محسوب می‌شود را به‌طور محسوسی نشان می‌دهد.

نتایج ارائه شده در این پژوهش، به‌صورت اولیه هیدرولیز پروتئین-های کازئین شیر گاو توسط گونه باکتری اسید لاکتیک جدا شده از شیر شتر را تایید کردند. اثر پروتئولیزی این باکتری توسط آزمون‌های SDS-PAGE و کروماتوگرافی فاز معکوس نیز به اثبات رسید. با توجه به نتایج آزمون الایزای رقابتی، فعالیت پروتئولیتیکی مناسب این سویه منجر به کاهش بیش از ۵۰ برابری حساسیت پروتئین $\alpha s_1$-کازئین هیدرولیز شده نسبت به پروتئین طبیعی شده و از این رو این سویه باکتریایی را کاندیدای بالقوه‌ای، برای کاهش حساسیت به شیر گاو معرفی می‌کند. در این مطالعه جداسازی سویه باکتری اسید لاکتیک از شیر شتر تک‌کوهانه شمال ایران به عنوان باکتری بومی مهم در صنایع لبنی با فعالیت پروتئولیتیکی و کاهش‌دهندگی حساسیت به شیر گاو، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. این سویه جدا شده از نمونه شیر بومی ایرانی می-تواند در نهایت برای تولید محصولات لبنی مختلف با آلرژی‌زایی کاهش یافته به کار رود. استفاده از این باکتری امکان تجزیه پروتئین کازئین بدون نیاز به استفاده از سایر روش‌ها مثل فرآیندهای حرارتی و یا فشار بالا را فراهم می‌کند. از طرف دیگر محصول تولید شده توسط این سویه‌ها ویژگی‌های تغذیه‌ای خود مثل طعم مناسب و ترشی کم را حفظ کرده و به دلیل آلرژی‌زایی کم خود قابل مصرف توسط افراد دارای حساسیت می‌باشد.

**منابع**


1. Ahmadova, A., EL-Ghaish, S. Choiset, Y. Rabesona, H. Drouet, M. Chobert, J. Kuliev, A. A. and Haertle, T. (2013). Modification of IgE binding to β-and $\alpha s_1$-caseins by proteolytic activity of *Lactobacillus helveticus* A75. Journal of Food Biochemistry, 37491-500.
2. Barzegar, S., Rosita, A. Pourpak, Z. Bemanian, M. H. Shokouhi, R. Mansouri, M. Cheraghi, T. Chavoshzadeh, Z. Mohammadzadeh, I. Fazlollahi, M. (2010). Common Causes of anaphylaxis in children: the first report of anaphylaxis registry in Iran. World Allergy Organization Journal, 3(1):9–13.
3. Crawford, L.V. (1960). Allergenicity of cow's milk proteins I. Effect of heat treatment on the allergenicity of protein fractions of milk as studied by the dual-ingestion passive transfer test, Pediatrics, 25: 432-436.
4. Dalgleish, D. G., Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. Annual Review of Food Science and Technology, 3: 449-467.
5. El-Agamy, E. (2007). The challenge of cow milk protein allergy, Small Ruminant Research, 68: 64-72
6. El-Ghaish, S., Ahmadova-Hadji-Sfaxi, A. I. El-Mecherfi, K. E. Bazukyan, I. Choiset,Y. Rabesona, H. Sitohy, M. Popov, Y. G. and Kuliev, A. A. (2011). Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods, Trends in Food Science and Technology, 22: 509-516.
7. El-Ghaish, S., Rabesona, H. Choiset, Y. Sitohy, M. Haertlé, T. Chobert, J. M. (2011) Proteolysis by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 isolated from Egyptian milk products decreases immuno-reactivity of $\alpha s_1$-casein, Journal of Dairy Research, 78: 203-210.
8. Isolauri, E., Sütas, Y. Mäkinen-Kiljunen, S., Oja, S. S. Isosomppi, R. Turjanmaa, K. (1995). Efficacy and safety of hydrolyzed cow milk and amino acid–derived formulas in infants with cow milk allergy, The Journal of Pediatrics, 127: 550-557.
9. Restani, P., Ballabio, C. Di Lorenzo, C. Tripodi, S. Fiocchi, A. (2009). Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 395:47-56.
10. Shi, J., Luo, Y. Xiao, Y. Li, Z. Xu, Q. Yao, M. (2014). Effects of fermentation by *Lactobacillus casei* on the antigenicity and allergenicity of four bovine milk proteins, International Dairy Journal, 35: 75-80.
11. Taufiq, T. T., Anindita, N. S. (2013). Fermented goat milk and cow milk produced by different starters of lactic acid bacteria: quality studies, Journal of Agricultural Science and Technology. A *3: 904*-911.
12. Terzic-Vidojevic Tolinacki, A. M., Nikolic, M. Lozo, J. Begovic, J. Gulahmadov, S. G. O. Kuliev, A. A. Dalgalarrondo, M. Chobert, J. Haertlé, T. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Azerbaijani traditional dairy products, African Journal of Biotechnology, 8(11): 2576-2588.

13. Tsabouri, S., Douros, K. Priftis, K. N. (2014). Cow's milk allergenicity, endocrine, metabolic and immune disorders-drug targets, Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine and Metabolic Disorders, 14:16-26.

14. Wal, J. M. (2004). Bovine milk allergenicity, Annals of Allergy, Asthma Immunology, 93: S2-S11.