نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۵، آذر- دی ۱۳۹۵، ص. ۶۰۸-۵۹۶

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 5, Dec- Jan 2017, p. 596-608

بررسی اثر ضدمخمری سویه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان بر مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا* به‌عنوان شاخص فساد آبمیوه

ندا نیری[۱]، محمدرضا عدالتیان *[۲]، محمد باقر حبیبی نجفی[۳]، معصومه بحرینی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۱۶
تاریخ پذیرش:۱۳۹۴/۰۲/۲۱

چکیده

هدف این تحقیق، بررسی اثر ضدمخمری سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان روی مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا واریته موسیلوجینوسا* (PTCC 5257) به‌عنوان عامل فساد مخمری آبمیوه و بررسی تاثیر فاکتورهای تکنولوژیکی مانند تاثیر دما، pH و بررسی تاثیر آنزیم پروتیئناز K بر خواص ضدمخمری سویه‌های مزبور است. بدین منظور از ۱۹ سویه،که ۳ سویه از شیر خام و ۸ سویه از دلمه و ۸ سویه از پنیر تازه لیقوان، استفاده شد. طیف فعالیت ضدمخمری، سویه‌ها توسط روش نقطه‌گذاری و روش نفوذ در چاهک تعیین شد، و به دنبال آن تعیین تاثیر فاکتورهای تکنولوژیکی یا فیزیکوشیمیایی مختلف از جمله درجه حرارت‌های (۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت، ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ و ۳۰ دقیقه، ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه (شرایط اتوکلاو)، pHهای ۲ تا ۷ و اثر آنزیم پروتئیناز K . نتایج حاصل، نشان داد که سویه C28 دارای بالاترین خاصیت ضد مخمری در هر دو روش نقطه‌گذاری و نفوذ در چاهک بوده است، و با افزایش pH اثر ضدمخمری کاهش می‌یابد. در بررسی اثر دما، در شرایط اتوکلاو هیچ‌گونه هاله شفافی مشاهده نشد. تمامی جدایه‌های مورد بررسی درحضور آنزیم پروتئیناز K خاصیت ضدمخمری خود را از دست دادند. در نهایت، می‌توان اینطور فرض کرد که سویه‌های ایزوله شده از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان یا عصاره فاقد سلول آن‌ها، به‌عنوان نگهدارنده زیستی در سیستم‌های غذای بخصوص در سیستم‌های غذایی اسیدی مانند آبمیوه، بکار روند.

واژه‌های کلیدی: پنیر لیقوان، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *رودوتورولا موسیلوجینوسا*، ضدمخمری

مقدمه

اخیراً، غذاهایی که در فرمولاسیون آن‌ها از نگهدارنده‌های شیمیایی استفاده شده، نگرانی مصرف‌کننده را بر می‌انگیزد و این نیاز را در صنعت ایجاد می‌کند که در جهت تولید غذاهای طبیعی و یا کمتر فراوری شده حرکت نماید. در نتیجه توجه صنعت غذا به استفاده از مواد ضدمیکروبی طبیعی جلب گردیده، به همین دلیل استفاده از ضدمیکروب‌های پپتیدی حاصل از باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) مورد توجه قرار گرفته است (Clevend *et al*., 2001).

بسیاری از گونه‌ها و سویه‌های موجود در طبیعت جهت حفظ موجودیت و یا موقعیت اکولوژیکی خود، سیستم‌های ضدمیکروبی خود را در برابر عوامل عفونت‌زا و مهاجم توسعه داده‌اند. تولید پپتیدهای ضدباکتریایی بخشی از ایمنی ذاتی یا اولیه محسوب می‌شود که در بسیاری از گونه‌ها یافت می‌شود. پپتیدهای ضدمیکروبی میزبان خود را توسط مکانیسم‌های مختلفی محافظت می‌کنند. معمولا با ایجاد منفذ در غشای سلول هدف، باعث نشت غیرقابل بازگشت مواد داخل سلولی و متعاقباً مرگ سلولی خواهند شد. پپتیدهای ضدمیکروبی سمیت متفاوتی نشان می‌دهند (Nissen-Meyer &Nes,1997).

پپتیدهایی که بصورت ریبوزومی سنتز می‌شوند و دارای ویژگی ضدمیکروبی نیز هستند، توسط طیف گسترده‌ای از ارگانیسم‌های زنده، که شامل پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌های عالی هستند، تولید می‌گردند. پپتیدهای ضدمیکروبی که توسط ریبوزوم در باکتری‌ها تولید می‌شوند، باکتریوسین نام دارند (Papagianni, 2003).

بسیاری از میکروارگانیسم‌های موجود در آب میوه‌جات به‌عنوان آلوده‌کنندگان مواد خام یا محیطی محسوب می‌شوند اما تعداد معدودی از آنها می‌توانند در شرایط اسیدی و اکسیژن کم رشد کنند. این میکروارگانیسم‌ها به دلیل این که در دما و pH پایین می‌توانند رشد کنند، ممکن است سبب مشکلات متعددی در صنایع فوق‌الذکر شوند، از جمله سبب آسیب اقتصادی جدی به صنایع نوشیدنی و لبنی گردند (Crowly *et al*., 2012).

مخمرها، عمده‌ترین گروه میکروارگانیسم‌ها هستند که موجب فساد نوشابه‌های بدون الکل و آب میوه‌ها می‌شوند و در صورت رشد میکروارگانیسم‌ها و تولید فرآورده‌های متابولیکی جانبی مانند Co_2 ، اسید و ترکیبات فاسدکننده، فساد قابل رؤیت است (Ashurst,

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار و استاد، گرو ه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد.
(* - نویسنده مسئول:Email:edalatian@um.ac.ir)

2005).

مطالعات فراوانی مبنی بر تولید ترکیبات ضدباکتری به وسیله باکتری‌های اسیدلاکتیک وجود دارد. باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌توانند دامنه وسیعی از ترکیبات ضدمیکروبی را تولید نمایند. این مواد، سایر باکتری‌های اسیدلاکتیک و نیز باکتری‌های پاتوژن و عوامل فساد ناشی از مواد غذایی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. از مواد ضدمیکروبی تولید شده توسط این میکروارگانیسم‌ها می‌توان به متابولیت‌های اکسیژن‌زا، استالدهید، ایزومرهای D اسیدهای آمینه، دی استیل، رئوترین، اسیدهای آلی و باکتریوسین اشاره نمود (Dodd & Gasson,1994 ؛ Lindgren &Dobrogosz,1990 , Yang & Chan, 2010 ؛ Stiles, 1996 ؛).

اما تعداد بررسی‌های صورت گرفته در زمینه اثر ضدقارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک بسیار کم است. در سال‌های اخیر مطالعات اندکی درباره خصوصیات و ترکیبات ضدقارچی و مکانیزم آن‌ها وجود دارد (Yang & Chan, 2010).

Crowly و همکاران (۲۰۱۲) دو جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ازکلم ترش و آب چاه را بر روی *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*، *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و *رودوتورولا موسیلوجینوسا* با روش چاهک بررسی نمودند. نتایج نشان داد که در طی ۹۶ ساعت کاهش قابل توجهی در تعداد مخمر رخ داد. نتیجه این بررسی نشان می‌دهد که مواد ضدمیکروبی حاصله از باکتری‌های ذکر شده تاثیر ممانعت‌کنندگی قابل توجهی بر روی شاخص‌های باکتریایی و قارچی دارد.

El-Mabrok و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر ضدقارچی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ایزوله شده از میوه‌های مالزیایی را بر روی *ژئوتریکوم گلئوسپوریوم بررسی نمودند. ۳۰ نمونه باکتری‌های اسیدلاکتیک* ایزوله شده از منابع مختلف را بر روی قارچ فوق‌الذکر با استفاده از روش نفوذ در چاهک و روش نقطه‌گذاری مورد پژوهش قرار دادند.

نتایج نشان داد که بیشترین قدرت ضدقارچی مربوط به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* API50CHL بود و اینکه سلول‌ها و سوپرناتانت‌های باکتری‌های *اسید لاکتیک* پتانسیل کاربرد به‌عنوان یک زیست نگهدارنده را بر علیه قارچ ذکر شده برای جایگزینی ضدقارچ‌های شیمیایی را دارند.

هدف اصلی این پژوهش، بررسی اثر ضدمخمری سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از مراحل مختلف تولید پنیر سنتی لیقوان بر روی مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا واریته موسیلوجینوسا* با PTCC 5257 به‌عنوان شاخص فساد آبمیوه و بررسی فاکتورهای تکنولوژیکی مختلف بر روی اثر ضدمیکروبی سوپرناتانت فاقد سلول این سویه‌ها، در سطح محیط کشت و یافتن موثرترین سویه مورد بررسی بر روی مخمر مزبور است.

مواد و روش‌ها

برای بررسی اثر ضدمخمری سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان (شیر، دلمه، پنیر تازه لیقوان)، از ۱۹ سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* که قبلا توسط تکنیک PCR (Polymerase Chain Reaction) با روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA تا حد جنس و گونه شناسایی شده بودند، استفاده گردید (Edalatian, *et al*., 2012).

بدین منظور از مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا واریته موسیلوجینوسا* با PTCC 5257 به‌عنوان شاخص استفاده شد. جهت بررسی اثر ضدمخمری جدایه‌های مذکوردر سطح محیط کشت از روش نقطه‌گذاری (Agar Spot) و برای بررسی اثر ضدمخمری مایع عاری از سلول (سوپرناتانت) جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از روش نفوذ در چاهک (Well Diffusion Assay) استفاده گردید.

تعیین میزان کلنی مخمر

بدین منظور بعد از کشت مخمرها در محیط کشت (PDB) Potato Dextrose Broth و سپری شدن زمان ۵-۳ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر و محلول ۰/۵ مک فارلند میزان کلنی‌های مخمر تعیین گردید. بدین صورت که محلول ۰/۵ مک فارلند برابر با $۱-۵\times۱۰^{۶}$ کلنی مخمر در هر میلی‌لیتر می‌باشد (کمیته استانداردهای آزمایشگاه بالینی۱۹۹۲).

آماده‌سازی سوپرناتانت فاقد سلول(CFS) Cell Free Supernatant

پس از کشت ایزوله‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به مدت ۲۴ ساعت در MRS براث (مرک) با دور، g ×۹۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ (سیگما-آلمان) شدند و سپس جهت استریل کردن از فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر (استات سلولز) عبور داده شدند (Yang & Chang, 2010).

روش نقطه‌گذاری (Agar Spot)

از ایزوله‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* یک کلونی به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت MRS براث و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از سپری شدن این مدت و ظهور کدورت در لوله‌های آزمایش، از هر ایزوله به میزان ۵ میکرولیتر در پلیت‌های حاوی MRS آگار (مرک) نقطه‌گذاری شدند، سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از این مدت، سطح پلیت‌ها با محیط کشت PDA حاوی آگار نرم (۰/۷۵درصد آگار) که تلقیح شده با $۱۰^{۶}$ کلنی مخمر به ازای هر میلی‌لیتر بود، در دو دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دو تکرار قرار

داده شدند. پس از گذشت ۲۴–۴۸ ساعت، نقطه‌ها از لحاظ قطر هاله شفاف تشکیل شده در اطراف آنها، مورد بررسی قرار گرفتند (Rouse, *et al*., 2008).

روش نفوذ در چاهک (Well diffusion Assay)

در پلیت‌های حاوی محیط کشت PDA (۱/۵ درصد وزنی حجمی آگار) تلقیح شده به میزان 10^6 کلنی مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا* به ازای هر۲۰ میلی‌لیتر از این محیط کشت، چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد شد. سپس در داخل هر یک از این چاهک‌ها، سوپرناتانت فاقد سلول باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به میزان ۱۰۰ میکرولیتر ریخته شدند. در مرحله بعد، پلیت‌ها بمنظور انتشار بهتر ترکیبات ضدمیکروبی در آگار، به مدت ۱ ساعت در دمای یخچال قرار گرفتند و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت پس از گذشت ۴۸ ساعت، پلیت‌ها و ایزوله‌ها از لحاظ قطر هاله شفاف در اطراف چاهک‌ها مورد بررسی قرار گرفتند (Yang & Chang, 2010).

آزمون‌های تکنولوژیکی

تاثیر pHهای مختلف بر مواد بازدارنده موجود در عصاره فاقد سلول جدایه‌ها

بدین منظور از pH ۲ الی ۷ (۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷) و برای تنظیم pH سوپرناتانت فاقد سلول از HCl و NaOH ۱ نرمال استفاده گردید. بدین صورت که پس از تهیه سوپرناتانت فاقد سلول به آن‌ها HCl و NaOH ۱ نرمال اضافه گردید (Wang *et al*., 2011). پس از تنظیم pH این سوپرناتانت‌ها، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به درون هر یک از چاهک‌های داخل پلیت‌ها ریخته شد.

لازم به ذکر است که این پلیت‌ها حاوی محیط کشت PDA بودند که از قبل با 10^6 کلنی مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا* به ازای هر ۲۰ میلی‌لیتر از PDA تلقیح شده بودند. پس از گذشت ۱ ساعت، پلیت‌ها درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸–۲۴ ساعت قرار داده شدند. بمنظور نمونه شاهد ازمحیط کشت MRS براث بدون تلقیح باکتری با pHهای ذکر شده استفاده گردید (Wang *et al*., 2011). این روش برای هر ۱۹ ایزوله و با حداقل ۲ تکرار انجام گرفت. نتایج به‌وسیله اندازه‌گیری قطر هاله بازدارندگی بر حسب میلی‌متر و بصورت میانگین دو تکرار گزارش شدند.

تاثیر دماهای مختلف بر مواد بازدارنده موجود در عصاره فاقد سلول جدایه‌ها

جهت بررسی این تیمار از دماهای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ و ۳۰ دقیقه (Cardoso *et al*., 2012)، ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه(شرایط اتوکلاو) (Rouse, *et al*., 2008)، ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت (Rouse, *et al*., 2008) استفاده گردید. سوپرناتانت فاقد عصاره یا CFE بدون هیچ‌گونه تیمار دمایی به‌عنوان نمونه شاهد به کار رفت. این سوپرناتانت ها، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به درون چاهک‌هایی درون محیط کشت حاوی 10^6مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا* به ازای هر۲۰ میلی‌لیتر ازPDA ریخته شد. و پس از حدود ۱ ساعت درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸–۲۴ ساعت قرار داده شد. این روش برای تمامی ۱۹ ایزوله و با حداقل ۲ تکرار انجام گرفت. نتایج به وسیله اندازه‌گیری قطر هاله بازدارندگی بر حسب میلی‌متر و به‌صورت میانگین دو تکرار گزارش شدند.

تاثیر آنزیم پروتئولیتیک بر مواد بازدارنده موجود در عصاره فاقد سلول جدایه ها

آنزیم پروتئیناز K، به سوپرناتانت فاقد سلول با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزوده شد. نمونه کنترل MRS براث حاوی آنزیم و سوپرناتانت تیمار نشده عاری از سلول بودند. تمامی نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس آنزیم مورد نظر توسط حرارت در مای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه غیرفعال گردید. خاصیت ضدمخمری سوپرناتانت عاری از سلول در برابر مخمر شاخص، با روش نفوذ در چاهک مورد بررسی قرار گرفت (Ghrairi, *et al*., 2005).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش، داده ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با آزمون فاکتوریل آنالیز شدند. برای آنالیز داده های مربوطه از نرم افزار(Mini Tab (Version 16 استفاده گردید. مقایسه میانگین با نرم افزار MSTATC صورت گرفت. نمودارها با نرم افزار Excel ترسیم شدند. تمامی آزمایشات با دو تکرار صورت گرفتند.

نتایج و بحث

در جدول ۱، نتایج مربوط به اثر ضدمخمری ۱۹ ایزوله *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به روش نقطه‌گذاری بر روی مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا* در دو درجه حرارت مختلف گرمخانه‌گذاری (۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد) آورده شده است . نتایج به‌صورت میانگین دو تکرار از قطر هاله بازدارندگی گزارش شدند. بیشترین قطر هاله مربوط به نمونه C28 با قطر۱۶ میلی‌متر و کمترین قطر هاله مربوط به نمونه LF 49 با قطر ۶ میلی‌متر می‌باشد.

جدول۱- نتایج اثر ضدمخمری ۱۹ سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ایزوله شده از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان در روش نقطه‌گذاری بر روی مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا* به‌صورت قطر هاله بازدارندگی بر حسب میلی‌متر

جدایه	میانگین قطر هاله	
	دمای ۲۵ درجه سانتی گراد	دمای ۳۰ درجه سانتی گراد
M6	۴	۴
M8	۴	۴
M11	۴	۴
C22	۴	۴
C24	۴	۴
C25	۱۱/۵±۰/۷۰۷*	۱۲
C26	۱۱/۷۵±۰/۳۵۳	۱۳±۰/۷۰۷
C27	۱۰/۷۵±۰/۳۵۳	۱۲/۲۵ ±۰/۳۵۳
C28	۱۶±۱/۴۱	۱۶
C29	۶/۷۵±۱/۰۶	۷/۲۵±۱/۰۶
C30	۱۲±۱/۴۱	۱۳
LF47	۴	۴
LF48	۱۰/۵	۱۱±۰/۷۰۷
LF49	۶±۰/۳۵۳	۶
LF51	۴	۴
LF52	۱۰/۵	۱۰/۵±۰/۷۰۷
LF55	۱۰/۷۵±۰/۳۵۳	۱۱
LF56	۴	۴
LF57	۷±۰/۷۰۷	۷/۵±۰/۷۰۷

C مخففCurd به معنی دلمه و LF مخففLighvan Fresh (پنیر تازه لیقوان) و M مخفف Milk (شیر) است .

*تمامی اعداد گزارش شده حاصل از مجموع قطر هاله شفاف و قطر نقطه ایجاد شده و بر حسب واحد میلی‌متر می باشند (قطر نقطه قرار داده شده ۴ میلی‌متر می‌باشد).

که در کل از بین ۱۹ ایزوله در ۱۱ ایزوله خاصیت ضد مخمری، هاله شفاف، مشاهده گردید.

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در حدود ۶۰ درصد جدایه‌ها دارای خاصیت ضدمخمری هستند. تاثیر دماهای گرمخانه‌گذاری ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد، روی قطر هاله ایجاد شده ناشی از اثر ضد مخمری ۱۹ جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، معنی‌دار بود ($p<0.05$)؛ بطوری که اکثراً در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قطر هاله بازدارندگی بیشتر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد بوده است. این عامل می‌تواند به دلیل رشد بهتر مخمر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۳۰ درجه سانتی‌گراد باشد و دیگر آنکه با توجه به مزوفیل بودن باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، امکان رشد و تولید متابولیت توسط این باکتری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۲۵ درجه سانتی‌گراد بیشتر امکان‌پذیر است (Edalatian, *et al*., 2012). محققان، پیشنهاد کرده‌اند که فعالیت ضدقارچی باکتری‌های اسید لاکتیک، به دلیل اثر سینرژیستی اسیدلاکتیک تولید شده توسط باکتری اسید لاکتیک و اسیداستیک موجود در محیط کشت MRS، می‌باشد (Cabo, *et al*., 2002). ولی اثر متقابل نوع جدایه‌ها و دماهای مورد بررسی تفاوت معنی‌داری نداشتند.

بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک، فلاوپروتئین، NADH اکسیداز و پراکسیداز دارند که توانایی تولید هیدروژن پراکسید در حضور اکسیژن را دارا می‌باشند. برخی از محققین فعالیت ممانعت‌کنندگی هیدروژن پراکسید را به اثر اکسیداسیونی قوی سلول‌ها و تخریب ساختار مولکول‌های اصلی پروتئین‌ها نسبت می‌دهند (Davidson, *et al*., 1983 ؛ Condon, 1987). فعالیت ممانعت‌کنندگی یا اسیدی کردن سیتوپلاسم نیروی حرکتی پروتئین[1]، مستقیماً بر غشا و رشد سلول‌های مخمر موثر هستند (Gerez, *et al*., 2013). پژوهشگران معتقدند که مولکول اصلی در فعالیت ضدقارچی، پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از یک کیلودالتون هستند

1 Protein Motive Force

(Gerez, *et al*., 2013). فعالیت ضدقارچی گونه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* توسط دیگر محققین نیز گزارش شده است (Crowly, *et al*., 2012 ؛ Rouse, *et al*., 2008).

Carla و همکاران (۲۰۰۹) گزارش داده‌اند که باکتری‌های اسید لاکتیک توانایی ممانعت از جوانه‌زنی و رشد میسیلیوم قارچ‌ها را بر عهده دارند. جوانه‌زنی کونیدی مرحله ای از رشد است که بیشترین حساسیت را به ممانعت‌کننده‌ها دارد.

در اغلب موارد نمی‌توان مکانیسم دقیقی از فعالیت ضدقارچی را تعریف نمود چون ترکیبی از واکنش‌های بین ترکیبات مختلف تولید شده در حین رشد سلول است و اغلب، اثرات تقویت کننده‌ای با هم دارند (Legan, 1993).

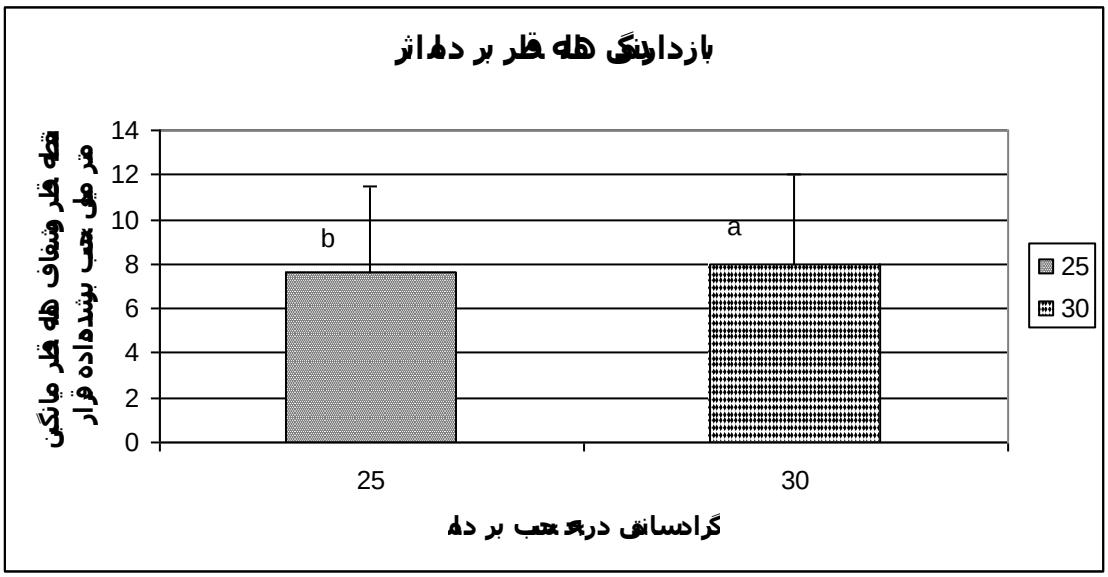
گزارش شده است که فعالیت ضدقارچی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* می‌تواند ناشی از بسیاری از اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک و فنیل لاکتیک اسیدها باشد (El-Mabrok, *et al*., 2013). همچنین گزارش شده است که سوسپانسیون *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* رشد *آسپرژیلوس فلاووس*، *رایزوپوس استولونیفر* و *بوتریتیس سینرا* را در خیار به تاخیر می‌اندازند (El-Mabrok, *et al*., 2013).

خواص ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک می‌تواند نسبت داده شود به دو عامل رقابت بر سر مواد غذایی و تولید ترکیبات بازدارنده مختلف از قبیل: اسیدهای آلی، باکتریوسین‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر ترکیبات مانند اتانول، پراکسید هیدروژن، دی‌اکسیدکربن، دی استیل، استالدئید(Ouwehand,1998) . در مورد فعالیت ضدقارچی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، باید عنوان کرد که ترکیبات فعالی از قبیل: دی پپتیدهای حلقوی، هیدروکسی اسیدهای چرب، ۳- فنیل لاکتیک اسید و سایر ترکیبات با وزن مولکولی پایین عامل این خاصیت هستند (Strom 2005).

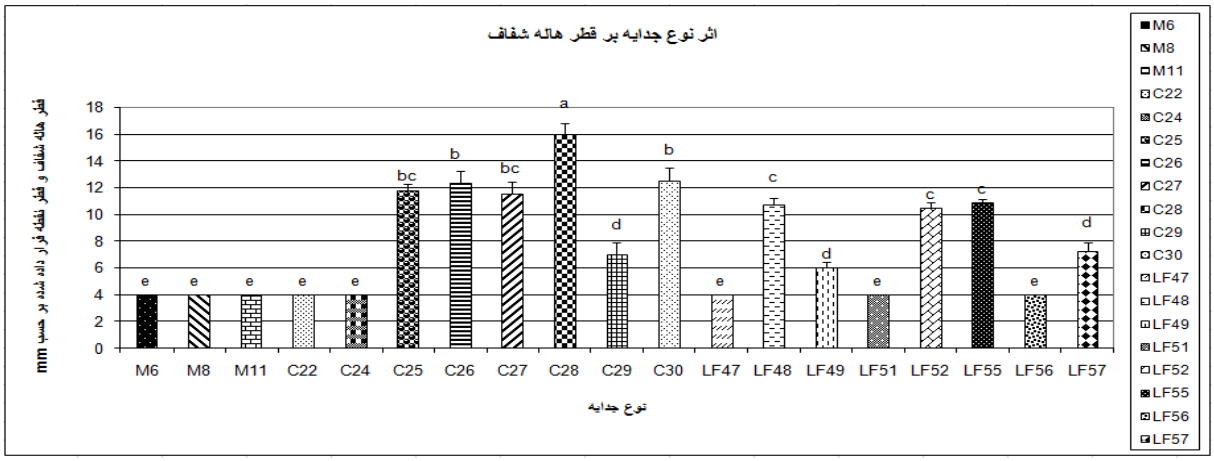
در جدول شماره ۲ نتایج مربوط به روش نفوذ در چاهک بر روی مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا* آورده شده است. بیشترین قطر هاله مربوط به ایزوله C28 با قطر ۱۱ میلی‌متر و کمترین قطر هاله مربوط به ایزوله LF۵۲ با قطر ۴ میلی‌متر بود.

ب الف

شکل۱- نمونه شاهد مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا* (الف) و جدایه‌هایی که بر آن خاصیت ضدمخمری دارند (ب)



شکل۲- تاثیر دمای گرمخانه‌گذاری مورد استفاده در روش نقطه‌گذاری بر خاصیت ضدمخمری جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از نظر قطر هاله شفاف بر حسب میلی‌متر



شکل ۳- اثر نوع جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر قطر هاله شفاف بر حسب میلی‌متر در روش نقطه‌گذاری

در مجموع، ۸ ایزوله از ۱۹ ایزوله در روش نفوذ در چاهک خاصیت ضدمخمری از خود نشان دادند.

در روش نفوذ در چاهک که نتایج آن در جدول (۲) آمده است در حدود ۴۲ درصد جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، دارای اثر بازدارندگی (هاله شفاف مشاهده شده در پلیت) بر روی مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا* بوده‌اند .

جدول ۲- نتایج روش نفوذ در چاهک بر روی مخمر رودوتورولا موسیلوجینوسا

شماره ایزوله	میانگین قطر هاله در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد
M6	۰
M8	۰
M11	۰
C22	۰
C24	۰
C25	۶/۲۵ ±۰/۳۵۳*
C26	۶/۵±۰/۷۰۷
C27	۰
C28	۱۰±۱/۴۱۴
C29	۰
C30	۸
LF47	۰
LF48	۵±۰/۷۰۷
LF49	۴/۵±۰/۷۰۷
LF51	۰
LF52	۴
LF55	۵/۷۵±۰/۳۵۳
LF56	۰
LF57	۰

*تمامی اعداد گزارش شده حاصل از تفاضل قطر هاله شفاف از قطر چاهک ایجاد شده و بر حسب واحد میلی‌متر می‌باشند .

C مخفف Curd به معنی دلمه و LF مخففLighvan Fresh (پنیر تازه لیقوان) و M مخفف Milk (شیر) است.

همانطور که از نتایج روش نقطه‌گذاری و روش نفوذ در چاهک مشخص است در حدود ۶۰ درصد جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در روش نقطه‌گذاری و ۴۲ درصد جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در روش نفوذ در چاهک دارای اثر بازدارندگی (هاله شفاف مشاهده شده در پلیت) بر روی مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوزا* بوده‌اند.

بدین معنی که در روش نقطه‌گذاری که خود جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و طبیعتاً متابولیت‌های تولید شده به‌همراه آن وجود دارد، اثر بازدارندگی بیشتری نسبت به زمانی که مایع عاری از سلول وجود دارد مشاهده گردیده است. بنابراین می‌توان اینطور نتیجه گرفت که این عامل احتمالا در اثر وجود خود جدایه‌ها می‌باشد. یعنی خود جدایه‌ها نیز دارای اثر بازدارندگی بر روی رشد مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوزا* داشته‌اند. معمولا در روش نقطه‌گذاری عاملی که سبب ایجاد هاله شفاف بازدارندگی می‌شود مربوط به ترکیبات ضد میکروبی وابسته به کلنی[1] مانند اسیدهای چرب و آب اکسیژنه که مسئول ایجاد خاصیت ضدمیکروبی در محیط کشت جامد یا همان نقطه‌گذاری می‌باشند (Alegría, *et al*., 2010).

نکته قابل توجه این است که در هر دو روش (روش نقطه‌گذاری و روش نفوذ در چاهک) در جدایه‌های مربوط به شیر خام هیچ‌گونه خاصیت ضدمخمری مشاهده نشد، این در حالی است که ۵۰ درصد جدایه‌های مربوط به دلمه و ۵۰ درصد جدایه‌های مربوط به پنیر تازه لیقوان دارای خاصیت ضدمخمری بودند. پس می‌توان گفت که احتمالاً خاصیت ضدقارچی در حین فراوری و مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان حاصل می‌گردد.

این عامل را می‌توان احتمالاً به دلیل اختلاف بین زیرگونه‌های مختلف باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مربوط دانست؛ چون در تعیین جدایه‌ها به روش توالی‌یابی PCR این باکتری‌ها تا حد گونه شناسایی شده‌اند و در نتیجه ممکن است اختلاف بین زیرگونه‌ها، سبب تفاوت در قطر هاله شفاف مشاهده شده توسط آن‌ها باشد. عدالتیان و همکاران (۲۰۱۱) ، تنوع زیادی را در بین سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان با کمک روش rep-PCR مشاهده و گزارش دادند.

Sharma و همکاران (۲۰۱۳) به بررسی اثر ضد کاندیدایی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* سویه ۱۱۴پرداختند. آنان به این نتیجه رسیدند که باکتریوسین‌ها سبب تخریب بیش از حد سلول‌های مخمر می‌شوند. آنان بیان کردند که بیشتر پپتیدهای کاتیونی مانند لاکتوفرین B و مشتقات لاکتوفرین B سبب اختلال در دیواره سلولی بر علیه *کاندیدا آلبیکانس* می‌شوند. آسیب دیواره سلولی به علت ایجاد نفوذپذیری بیشتر غشاء به کاتیون‌هایی مانند K^+ و ماکرومولکول‌های بزرگی مانند ATP می‌باشد. این موضوع نشان می‌دهد که سوپرناتانت یا عصاره فاقد سلول سبب اختلال در دیواره سلولی می‌شود.

مطالعات نشان می‌دهد که برخی از ترکیبات محلول در سوپرناتانت ممکن است مسئول اثر بازدارندگی باشند (Hamed, *et al*., 2011) (Sathe, *et al*., 2007). در روش نفوذ در چاهک یا بررسی ترکیبات ضدمیکروبی در محیط مایع یا براث عوامل مختلفی از جمله مواد بازدارنده موجود در پالیده کشت میکروبی (سوپرناتانت) مانند باکتریوسین‌ها و اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک مسئول ایجاد هاله شفاف بازدارندگی هستند. موارد دیگری مانند رئوترین، دی‌استیل، ایزومرهای D اسیدآمینه و غیره نیز موثرند (Piard, *et al*., 1991).

اسیدهای آلی تولید شده به وسیله باکتری‌های اسید لاکتیک با زنجیره کوتاه مانند اسید استیک و یا اسید لاکتیک عمدتاً برای تولید غذا به‌عنوان نگهدارنده ضدمیکروبی در تولید غذاهای مختلف بکار می‌رود (Davidson, *et al*., 1990).

آنچه مشخص است این است که فرم اسید لاکتیک یونیزه نشده به غشای سیتوپلاسمی سلول نفوذ کرده و منجر به کاهش pH داخلی سلول و تخریب نیروی حرکتی پروتون Proton Motive Force (PMF) درغشای انتقالی شده و در نهایت سبب مرگ سلول و نیز جلوگیری از جوانه‌زنی مخمرخواهد شد (Crowly, *et al*., 2012).

عامل دیگر خاصیت ضدمیکروبی باکتری‌های *اسید لاکتیک* را می‌توان به خصوصیت چلاته‌کننده اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک، اسید استیک، اسید فرمیک و غیره دانست؛ که این اسیدها عناصر ضروری برای رشد، مانند آهن را چلاته می‌کنند و در نتیجه به‌عنوان یک عامل دیگر ممانعت‌کننده از رشد یاد می‌شود. در این بین اسید لاکتیک مهم‌ترین خاصیت ضدمیکروبی را دارا می‌باشد (Sirgid, *et al*., 2006).

در تحقیقی که اوکازایا و همکاران (۲۰۰۵) بر خاصیت ضدمخمری لاکتوباسیلوس‌های ایزوله شده از پنیر ترکی پرداختند، نتایج نشان داد که *لاکتوباسیلوس کازئی* تا اندازه‌ای در به تعویق انداختن رشد مخمرها موثر است.

تحت شرایط خاصی برخی از *لاکتوباسیل*‌ها در اثر فعالیت لیپولیتیک خود ممکن است تولید اسیدچرب کنند، فعالیت ضدقارچی اسیدهای چرب بستگی به طول زنجیره، غلظت و pH محیط دارد. فعالیت ضدمیکروبی اسیدهای چرب ناشی از مولکول تفکیک نشده است، نه آنیون، زیرا pH تاثیر زیادی بر روی فعالیتشان ندارد ولی در pH پایین اثر کشندگی آنها افزایش می‌یابد (Yang, 2000).

فعالیت بازدارندگی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در هر دو حالت سلول‌ها و سوپرناتانت گونه‌های ضدقارچی با مطالعات قبلی سازگار است (Lavermicocca, *et al*., 2000؛ Belal, *et al*., 2011 ؛ Gerez, *et al*., 2013).

1 Colony – associated antimicrobial compound

این محققین گزارش داده‌اند که گونه‌هایی از باکتری‌های اسید لاکتیک توانایی ممانعت کنندگی از جوانه‌زنی کونیدی و رشد میسیلیوم را دارند.

در جدول شماره ۳ نتایج مربوط به تاثیر pHهای مختلف روی فعالیت ضدمخمری سوپرناتانت فاقد سلول (CFS) جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ایزوله شده از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان آورده شده است. همانطور که ملاحظه می‌گردد بیشترین تاثیر در pH =۲ و کمترین تاثیر در pH =۷ مشاهده گردید.

جدول ۳- نتایج تاثیر pH های مختلف سوپرناتانت فاقد سلول ۱۹ ایزوله *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* روی فعالیت ضدمخمری آن‌ها

شماره جدایه	قطرنمونه شاهد	pH=۲	pH=۳	pH=٤	pH=٥	pH=٦	pH=۷
M6	۰	۳±۰/۷۰۷*	۲/۵±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
M8	۰	۳±۰/۷۰۷	۳	۰	۰	۰	۰
M11	۰	۳/۵±۰/۷۰۷	۳±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
C22	۰	۳±۰/۷۰۷	۲/۵±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
C24	۰	۳/۵±۰/۷۰۷	۳±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
C25	۶/۲۵ ±۰/۳۵۳	۷±۰/۷۰۷	۶/۷۵±۰/۷۰۷	۶/۵	۶±۰/۳۵۳	۰	۰
C26	۶/۵±۰/۷۰۷	۷/۵±۰/۷۰۷	۷±۰/۷۰۷	۶/۲۵±۰/۳۵۳	۶/۵	۰	۰
C27	۰	۳±۰/۷۰۷	۲±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
C28	۱۰±۱/۴۱۴	۱۴/۵±۰/۷۰۷	۱۳±۱/۴۱۴	۱۲±۰/۷۰۷	۱۰/۵±۰/۷۰۷	۶±۰/۷۰۷	۰
C29	۰	۳±۰/۷۰۷	۳	۰	۰	۰	۰
C30	۸	۱۰±۰/۷۰۷	۹±۰/۷۰۷	۸/۵±۰/۷۰۷	۷/۵±۰/۷۰۷	۳	۰
LF47	۰	۳±۰/۷۰۷	۲/۵±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
LF48	۵±۰/۷۰۷	۷/۲۵±۰/۷۰۷	۶/۵±۰/۷۰۷	۶±۰/۳۵۳	۵/۵±۰/۳۵۳	۰	۰
LF49	۴/۵±۰/۷۰۷	۶/۵±۰/۷۰۷	۵/۵±۰/۷۰۷	۵±۰/۳۵۳	۲/۵±۰/۳۵۳	۰	۰
LF51	۰	۲/۵±۰/۷۰۷	۲±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
LF52	۴	۷/۵±۰/۷۰۷	۶/۵±۰/۷۰۷	۴±۰/۷۰۷	۴±۰/۳۵۳	۰	۰
LF55	۵/۷۵±۰/۳۵۳	۹±۰/۷۰۷	۸±۰/۷۰۷	۶/۵±۰/۷۰۷	۵±۰/۷۰۷	۰	۰
LF56	۰	۳/۵±۰/۷۰۷	۲/۵±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
LF57	۰	۳±۰/۷۰۷	۲±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰

*تمامی اعداد گزارش شده حاصل از تفاضل قطر هاله شفاف از قطر چاهک ایجاد شده و بر حسب واحد میلی‌متر می‌باشند .

نتایج تاثیر pHهای مختلف مایع عاری از سلول جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا* در جدول ۳ آورده شده است. نتایج نشان داد که بیشترین تاثیر ضدمخمری در pH=۲ وجود دارد بطوری که حتی جدایه‌هایی که در نمونه شاهد فاقد اثر ضدمخمری بودند در pH=۲ و ۳خاصیت ضدمخمری از خود نشان دادند. این‌طور بنظر می‌رسد که بسیاری از مواد ضدمیکروبی از جمله باکتریوسین‌ها و مواد شبه باکتریوسین بطور قابل ملاحظه‌ای نسبت به شرایط اسیدی در مقایسه با شرایط قلیایی مقاوم‌تر هستند. از نظر پایداری جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان نسبت به pHهای متفاوت، کاملاً مشهود است که جدایه C28 در مقایسه با سایر جدایه‌ها نسبت به شرایط قلیایی مقاوم‌تر است؛ این‌طور بنظر می‌رسد که با افزایش pH، اثر ضدمخمری کاهش می‌یابد، به‌طوریکه در pH =۷ هیچ‌گونه خاصیت ضدمخمری مشاهده نشده است. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج تحقیقی که بر روی خواص ضدقارچی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* از کومیس بر دو کپک *پنی سیلیوم راکوفورتی* و *آسپرژیلوس نایجر* انجام شده است، همخوانی دارد. به طوری که یافته های آنان نیز نشان می دهد که بیشترین فعالیت ضد قارچی در pH =۳/۸-۳ مشاهده شد و با افزایش pH (از ۳/۸ تا ۷) قطر هاله شفاف حاصل از تاثیر بازدارندگی کاهش می‌یابد (Wang, *et al*., 2011) و همچنین نتایج حاصل، با نتایج پژوهش Valerio و همکاران (۲۰۰۹) که به بررسی فعالیت ضدقارچی باکتری‌های *اسید لاکتیک* جداشده از گندم دوروم ایتالیایی بر روی کپک‌های *پنیسیلیوم روکوفورتی* و *آسپرژیلوس نایجر* پرداخته بودند، مطابقت دارد، بطوری که در pH بالاتر از ۴، فعالیت ضدقارچی

کاهش می‌یابد (Valerio, *et al*.,2009). نکته قابل توجه در مورد اثر pHهای مختلف بر فعالیت ضدمخمری جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* این بود که این جدایه‌ها در pHهای اسیدی که اغلب در آبمیوه‌جات مشاهده می‌شود، فعالیت ضدمخمری بیشتری را بر مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا* که عامل و شاخص فساد آبمیوه‌جات هستند، از خود نشان دادند. این امر می‌تواند یک نقطه قوت و قابل توجه جهت پتانسیل بکارگیری این سویه‌ها در محصولات اسیدی از جمله آبمیوه‌جات باشد.

در جدول ۴، نتایج مربوط به اثر دماهای مختلف بر روی مقاومت ترکیبات ضدمیکروبی موجود در سوپرناتانت باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر مخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا* آورده شده است.

جدول ٤- نتایج تاثیر دماهای مختلف بر روی قطر هاله بازدارندگی به‌عنوان شاخصی بر مقاومت ترکیبات ضدمیکروبی موجود در سوپرناتانت فاقد سلول ۱۹ ایزوله *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* برمخمر *رودوتورولا موسیلوجینوسا* بر حسب میلی‌متر

	قطر هاله بازدارندگی در شرایط ذیل بر حسب میلی‌متر				
شماره جدایه	نمونه شاهد(حرارت ندیده)	۶۰ دقیقه -۸۰° C	۱۰ دقیقه -۱۰۰° C	۳۰ دقیقه -۱۰۰° C	۱۵-۱۲۱° C دقیقه
M6	۰	۰	۰	۰	۰
M8	۰	۰	۰	۰	۰
M11	۰	۰	۰	۰	۰
C22	۰	۰	۰	۰	۰
C24	۰	۰	۰	۰	۰
C25	۶/۲۵ ±۰/۳۵۳*	۴/۵±۰/۷۰۷	۵/۲۵±۰/۷۰۷	۴/۷۵±۰/۷۰۷	۰
C26	۶/۵±۰/۷۰۷	۴/۲۵±۰/۷۰۷	۳/۵±۰/۷۰۷	۳	۰
C27	۰	۰	۰	۰	۰
C28	۱۰±۱/۴۱۴	۸±۰/۷۰۷	۹±۰/۷۰۷	۷/۵±۰/۷۰۷	۰
C29	۰	۰	۰	۰	۰
C30	۸	۵/۵±۰/۷۰۷	۶±۰/۷۰۷	۴/۷۵±۰/۷۰۷	۰
LF47	۰	۰	۰	۰	۰
LF48	۵±۰/۷۰۷	۳/۵	۴±۰/۳۵۳	۳/۷۵±۰/۳۵۳	۰
LF49	۴/۵±۰/۷۰۷	۳±۰/۳۵۳	۳/۷۵	۳/۵±۰/۷۰۷	۰
LF51	۰	۰	۰	۰	۰
LF52	۴	۳±۰/۷۰۷	۳/۵±۰/۷۰۷	۳±۰/۷۰۷	۰
LF55	۵/۷۵±۰/۳۵۳	۴±۰/۷۰۷	۵±۰/۷۰۷	۴/۵±۰/۷۰۷	۰
LF56	۰	۰	۰	۰	۰
LF57	۰	۰	۰	۰	۰

*تمامی اعداد گزارش شده حاصل از تفاضل قطر هاله شفاف از قطر چاهک ایجاد شده و بر حسب واحد میلی‌متر می‌باشند .

نتایج تاثیر مایع عاری از سلول (CFE) در تیمارهای مختلف درجه حرارت بر فعالیت ضدمخمری *رودوتورولا موسیلوجینوسا* (جدول ۴) نشان داد که در بکارگیری دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تمامی جدایه‌ها خاصیت ضدمخمری خود را از دست داده‌اند. نکته قابل تامل دیگر آن است که قطر هاله بازدارندگی در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بیشتر از قطر هاله بازدارندگی در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه بوده است. این نشان می‌دهد که مقاومت حرارتی در یک دمای ثابت (دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) در زمان ۳۰ دقیقه کمتر از زمان ۱۰ دقیقه بوده است. در نتیجه ترکیبات ضدمیکروبی و شبه باکتریوسینی با افزایش دما و یا افزایش زمان در صورت اعمال حرارت (در این جا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) به حرارت حساس شده و خاصیت خود را از دست می‌دهند. این مقاومت نسبی به حرارت نشان می‌دهد که در مایع عاری از سلول ترکیباتی با وزن مولکولی کم وجود دارد (Wang, *et al*., 2011). نتایج مطالعه حاضر با نتایج حاصل از پژوهش Cardoso و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارد. آنان به بررسی اثر ضدمیکروبی مایع عاری از سلول *انتروکوکوس فکالیس* بر روی مخمرها، قارچها و باکتری‌ها پرداختند و بیان کردند که با افزایش دما و یا افزایش زمان حرارت‌دهی، اثر ضدمیکروبی کاهش می‌یابد (Cardoso, *et al*., 2012). نکته کاربردی و قابل توجه در مورد اثر درجه حرارت‌های مختلف این است تمام جدایه‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد که شرایط استریل کردن در اتوکلاو می‌باشد، خاصیت ضدمخمری خود را

از دست داده‌اند، ولی در صنعت آبمیوه‌جات و نوشیدنی‌های اسیدی که خطر آلودگی به مخمرهایی از قبیل *رودوتورولا موسیلوجینوسا* وجود دارد، از این فرایند حرارتی شدید استفاده نمی‌شود، بلکه از دماهای پایین‌تر مانند دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد یا کمتر برای پاستوریزاسیون آبمیوه جات استفاده می‌شود. این نکته، احتمال بکارگیری این جدایه‌ها یا سوپرناتانت آنها را در مواد غذایی اسیدی مانند آبمیوه‌جات، که نیاز به فرایندهای حرارتی شدید و بالای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد ندارند، را تقویت می‌بخشد.

جهت تعیین حضور باکتریوسین یا تایید ماهیت پروتئینی ترکیبات ضدمیکروبی موجود در سوپرناتانت فاقد سلول، از اثر آنزیم پروتئیناز K بر فعالیت ضدمخمری این جدایه‌ها استفاده گردید. همانطور که قبلا ذکر شده بود باکتریوسین‌ها ماهیت پروتئینی دارند.

قابلیت بازدارندگی سوپرناتانت جدایه‌هایی که دارای خاصیت ضدمخمری بودند در مجاورت آنزیم پروتئیناز K پس از یک ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به طور کامل از بین رفت، جدایه‌های LF52 ,LF49 ,LF48 ,C30, C28, C26, C25 و LF55 هیچ یک دارای خاصیت بازدارندگی بر مخمر *رودوتورولا* نبودند. می‌توان به این نتیجه رسید که ترکیبات ضدمخمری تولید شده توسط این جدایه‌ها احتمالا دارای ماهیت پروتئینی بودند. این نتایج با یافته‌های Cardoso و همکاران (۲۰۱۲) و Rouse و همکاران (۲۰۰۸) همخوانی دارد.

نتیجه‌گیری

بطور خلاصه در این پژوهش بمنظور بررسی اثر ضدمخمری جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مورد نظر با استفاده از روش نقطه‌گذاری و روش نفوذ در چاهک استفاده شد و تاثیر هر کدام از متغیرهای تکنولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش pH اثر ضدمخمری کاهش می‌یابد بطوری که بیشترین تاثیر ضدمخمری در ۲ و pH=۳ وجود داشت. با افزایش دما و یا افزایش زمان حرارت‌دهی، کاهش اثر ضدمخمری مشاهده شد، بطوری که در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه هیچ‌گونه اثر ضدمخمری مشاهده نشد. در حضور آنزیم پروتئیناز K هیچ کدام از جدایه‌ها از خود خاصیت ضدمخمری نشان ندادند.

منابع

Alegría, Á. , Delgado, S. , Roces, C. , López, B., & Mayo, B., 2010, Bacteriocins produced by wild Lactococcus lactis strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk, *International Journal of Food Microbiology*, 143 , 61–66.

Ashurst, P.R., 2005, Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices 2nd ed . *Blackwell Publishing*, pp.57-62.

Belal, J.M. & Zaiton, H., 2011, Antifungal activity of Lactobacillus fermentum Te007, Pediococcus pentosaceus Te010, Lactobacillus pentosus G004, and L. paracasi D5 on selected foods. *Journal of Food Science*, 76, 493-499.

Cabo, M.L., Braber, A.F. & Koenraad, P., 2002, Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against Penicillium discolor is due to acetic acid in the medium. *Journal of Food Protection*, 65, 1309-1316.

Cardoso, M., Manzo, R., Tonarelli, G., & Simonetta , A., 2012, Characterisation of a Cell free supernatant obtained from cultures of Enterococcus faecalis DBFIQ E24 with antagonisyic activity against bacteria,yeast and moulds, International *Journal of Dairy Technology*,65,568-577.

Carla, L. G., Maria, I. T. , Graciela, R., & Graciela, F.V., 2009, Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, 20, 144-148.

Clevend, j., Montviie, T.J.,Nes, I.F. & Chikindas, M.L., 2001, Bacteriocins: safe , natural antimicrobials for food preservation. International *Journal of Food Microbiology*, 71(1), 1-20.

Condon, S., 1987, Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS *Microbiology Reviews* 46, 269–280.

Crowly, S., Mahony, J., & Van Sinderen, D., 2012, Comparative analysis of two antifungal Lactobacillus plantarum isolates and their application as bioprotectants in refrigerated foods.*Journal of Applied Microbiology*, 113, 1417-1427.

Davidson, P.M., & Juneja, V.K., 1990, Antimicrobial agents. In: Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S. (Eds.), Food Additives. *Marcel Dekker*, Inc., New York, pp. 1–9.

Davidson, P.M., Post, L.S., Branen, A.L., McCurdy, A.R., 1983, Naturally ocurring and miscellaneous foods antimicrobials. In: Davidson, P.M., Branen, A.L. (Eds.), Antimicrobials in Foods. *Marcel Dekker Inc.*, New York, pp. 385–392.

Dodd , H.M. , & Gasson , M.J. , 1994 , Bacteriocins of lactic acid bacteria. In: Gasson , M.J. , deVos, W.M. (Eds.) , Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria , Blackie Academic and Professional , *London* , 211–251.

Edalatian , M.R. , Habibi Najafi, M.B., Mortazavi, S.A., Alegria, A., Nassiri, M.R., Bassami, M.R.,& Mayo, B., 2012 , Microbial diversity of the traditional Iranian cheeses Lighvan and Koozeh, as revealed by polyphasic culturing and culture-independent approaches, *Dairy Science and Tecnology*,92,75-90.

El-Mabrok , A. S. W., Hassan, Z. , Mokhtar, A. M. , & Hussin, K. M. A. , 2013 , Antifungal Activity of Lactobacillus plantarum LAB-C5 and LAB-G7 Isolated from Malaysian Fruits , *Acta Biologica Malaysiana*, 2(1): 22-30.

Gerez ,C.L., Torres, M.J. , . Font de Valdez , G., & Rollan ,G., 2013, Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*, 64 , 231–237 .

Ghrairi, T., Fre`re , J., Berjeaud, J.M., & Manai, M., 2005, Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by Lactococcus lactis isolated from rigouta cheese. *International Journal of Food Microbiology* 105, 389–398.

Hamed, H. A., Yomna, A. M., & Shadia, M. A., 2011, In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against Fusarium oxysporum for protection of tomato plant. *Life Science Journal*, 8, 462-468.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., & Gobbetti, M., 2000, Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough Lactobacillus plantarum strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4084-4090.

Legan, J. D. , 1993, Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 32, 33-53.

Lindgren , S.E., & Dobrogosz , W.J., 1990, Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations , FEMS *Microbiology Reviews*, 87, 149–164.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. 2nd ed. M27-A2. Wayne, PA: NCCLS; 1992.

Nissen-Meyer , J., & Nes, I.F., 1997, Ribosomally synthesized antimicrobial peptides:their function , structure, biogenesis and mechanism of action . *Archives of Microbiology*, 167:67-77.

Ouwehand, A. C. (1998) Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects ed. Salminen, S. and von Wright, A. pp. 139–159. New York: Marcel Dekker. Inc.

Ozkaya, F., Karabicak, N., Kayali, R., & Esen, B., 2005, Inhibition of yest isolated from traditional Turkish Cheeses by Lactobacillus spp., *International Journal of Dairy Thechnology*,58(2), 111-114.

Papagianni, M., 2003, Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function , and applications. *Biotechnology Advances* , 21, 465-499.

Piard ,J., & Desmazeaud ,C., 1991, Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1.Oxygen metabolites and catabolism end-products , Lait,71(5),525-541.

Rouse, S., Harnett, D., Vaughan, A., & Sinderen, D. van., 2008, Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology* 104, 915–923.

Sathe, S., Nawani, N., Dhakephalkar, P., & Kapadnis, B., 2007, Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2622-2628.

Sharma, A., & Srivastava, S., 2013, Anti-Candida activity of spent culture filtrate of Lactobacillus plantarum strain LR/14. *Journal de Mycologie Médicale*, 440, No. of pages 10.

Sirgid , C.J. , Tine , L.A., Desair , J. , Marchal , K. , Vanderleyden , J. , & Naggy , I. , 2006 , Strong antimicrobial activity of Lactobacillus rhamnosus GG against , Salmonella typhimurium is due to accumulation of lactic acid , FEMS *Microbial Lett* , 259 , 89- 96.

Stiles , M.E. , 1996 , Biopreservation by lactic acid bacteria , Antonie van Leeuwenhoek ,70, 331–345.

Strom, K. (2005) Fungal Inhibitory Lactic Acid Bacteria. PhD *Thesis*: Swedish University of Agricultural Sciences .

Valerio ,F.,Favilla ,M. , De Bellis, P., & Sisto, A., 2009 , Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against Penicillium roqueforti, Aspergillus niger and Endomyces fibuliger contaminating bakery products , *Systematic and Applied Microbiology*, 32 , 438–448.

Wang, H., Shi, J., Zhang, H., & Qi, W., 2011, A survey of some antifungal properties of lactic acid bacteria isolates from koumiss in China, *International Journal of Dairy Technology*, 64,585-590.

Yang , E.J. , & Chan, H.C., 2010, Purification of a new antifungal compound produced by Lactobacillus plantarum AF1 isolated from kimchi , *International Journal of Food Microbiology* , 139 , 56-63.

Yang, Z., 2000, Anti microbial compounds and extracellular polysaccharides prouduced by Lactic Acid Bacteria: structures and properties,Ph.D *thesise* , University of Helsinki .

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 5, Dec- Jan 2017, p. 596-608

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۵، آذر- دی ۱۳۹۵، ص. ۶۰۸-۵۹۶

Study the effect of*Lactobacillus plantarum*strains isolated fromdifferent stages of productionLighvan cheese on *Rodotorulamucilaginosa* as a spoilage indicator in fruit juice

N. Nayyeri[1], M. R. Edalatian[*2], M. B. Habibi Najafi[3], M. Bahreyni[4]

Received: 2014.07.07
Accepted: 2015.05.11

Introduction: Nowadays, attention to foods free from chemical preservatives is on the rise. Recently, consumers have concerned about foods containing these preservatives in their formulation .Therefore,the use of antimicrobial peptides produced by Lactic acid bacteria (LAB) are strongly highlighted. Ribosomally-synthesized peptides, which possess antimicrobial properties, are produced by a vast range of organisms including prokaryotes and Eukaryotes.

Yeasts are the most important microorganisms which are responsible for fruit juice and soft drink spoilage. In case of growth and production of by-products like CO2, acid and other contaminants, the spoilage will be visible.

Lactic acid bacteria isolated from natural, local sources such as dairy products have presented potentially antifungal features against food spoilage fungi. Among these, Rodotorula and Penicillium are regarded as the most critical genera in fruit juice spoilage.

The main objective ofthis study was the evaluation of anti-yeast activity of Lactobacillus plantarum isolates from different stages of Lighvan production against *Rodotorulamucilaginosa* as fruit juice spoilage indicator. In the next step, technological parameters effects were analyzed on antimicrobial potential of cell-free supernatant of these isolates. Finally, we aimed at finding the most effective isolate on aforementioned yeast.

Materials and methods: NineteenLb.plantarumisolates, which were identified previously, were subjected to antifungal assay. For this purpose, RodotorulamucilaginosaPTCC 5257 was selected. Agar spot and Well Diffusion Assay (WDA) were applied for antifungal assay in solid and liquid media, respectively.Determination of yeast colony: Following the cultivation of yeasts in Potato Dextrose Broth, it was determined using Spectrophotometer.

Preparation of *Lb.plantarum* cell-free supernatant (CFS) was carried out. In agar spot method, clear zones of inhibition around the spotted colonies were evaluated after 24-48h incubation. In WDA, CFS of *Lb.plantarum* isolates were poured in wells and clear zones were evaluated around each well after 24-48 h incubation.

Technological properties: The influence of different levels of pH (2, 3, 4, 5, 6, and 7) was analyzed on CFS of *Lb.plantarum* isolates. This assay was done according to Wang et al., 2011. Finally, results were reported using the measurement of clear zone diameter in mm. All experiments were performed in duplicates.

The effects of various temperatures were applied on CFS and remaining the antifungal activity was evaluated according to Rouse et al., 2008. Finally, all CFS of *Lb.plantarum* isolates were subjected to Proteniase K and antifungal properties of CFS were assayed by WDA according to Ghrairi et al., 2005.

Results and discussion: Agar spot results showed the highest and lowest clear zone of inhibition related to C28 and LF49 with 16 and 6 mm diameter, respectively. In this method, 11 out of 19 isolates (60%) presented anti-yeast activity with clear zone formation. In comparison between two incubation temperatures (25 and 30◦C), all isolates stronger clear zone in 30◦C than in 25◦C. This was due to enhancement of yeast growth in 25C rather than in 30C. Also, with respect to the mesophilic nature of *Lb.plantarum* isolates, the possibility of metabolite production are more likely in 30C. It was reported that antifungal activity of LAB is mostly due to synergistic effect of lactic acid and acetic acid. In agar spot, some colony-associated antimicrobial compounds are responsible for antifungal activity.

In WDA, 8 out of 19 isolates (42%) were positive for their inhibitory effects. The highest anti-yeast activity

1, 2 and 3. Former M.Sc. Student, Assistant Professor and Professor, Department of Food science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashad.

4- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad.

(*-Corresponding Author Email: edalatian@um.ac.ir)

was seen at pH=2. It seems that antimicrobial compounds are likely more stable at acidic conditions than at alkaline ones. Among isolates, C28 presented the highest stability at alkaline conditions. With pH increase, the antifungal activity decreased so that no anti-yeast activity was seen at pH=7. Regarding the different temperatures, we should mention that thermal resistance of isolates' CFSwitnessed declining trend with increasing of temperature. This fact implies the presence of low- molecular weight compounds in CFS. Finally, all isolates' CFS was subjected to proteinase K. All isolates have lost their anti-yeast activity after enzyme treatment showing their proteinaceous nature.

Conclusion: In WDA, the number of positive isolates showing anti-yeast activity declined in comparison with agar spot. Since some isolates retain their inhibitory activity toward food spoilage yeast at low pH, their CFS can be applied in acidic foods like fruit juice. Also, some isolates showed their antifungal activity at high temperatures (80C and 100C) which are applied for fruit juice pasteurization, so they can be applied in fruit juices as a bio-preservative.

Keywords: Lighvan cheese, *Lactobacillusplantarum*, anti-yeast, *Rodotorulamucilaginosa*.