



بررسی اثر ضد مخمری سویه های لاکتوباسیلوس پلانناروم جدا شده از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان بر مخمر رودوتورولا موسیلوجینوسا به عنوان شاخص فساد آبمیوه

ندا نیری^۱، محمدرضا عدالتیان*^۲، محمد باقر حبیبی نجفی^۳، معصومه بحرینی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۲۱

چکیده

هدف این تحقیق، بررسی اثر ضد مخمری سویه های لاکتوباسیلوس پلانناروم جدا شده از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان روی مخمر رودوتورولا موسیلوجینوسا واریته موسیلوجینوسا (PTCC 5257) به عنوان عامل فساد مخمری آبمیوه و بررسی تاثیر فاکتورهای تکنولوژیکی مانند تاثیر دما، pH و بررسی تاثیر آنزیم پروتئیناز K بر خواص ضد مخمری سویه های 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 ضد مخمری، سویه ها توسط روش نقطه گذاری و روش نفوذ در چاهک تعیین شد، و به دنبال آن تعیین تاثیر فاکتورهای تکنولوژیکی یا فیزیکی شیمیایی مختلف از جمله درجه حرارت های (۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت، ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ و ۳۰ دقیقه، ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه (شرایط اتوکلاو)، pH های ۲ تا ۷ و اثر آنزیم پروتئیناز K. نتایج حاصل، نشان داد که سویه C28 دارای بالاترین خاصیت ضد مخمری در هر دو روش نقطه گذاری و نفوذ در چاهک بوده است، و با افزایش pH اثر ضد مخمری کاهش می یابد. در بررسی اثر دما، در شرایط اتوکلاو هیچ گونه هاله شفاف مشاهده نشد. تمامی جدایه های مورد بررسی در حضور آنزیم پروتئیناز K خاصیت ضد مخمری خود را از دست دادند. در نهایت، می توان اینطور فرض کرد که سویه های ایزوله شده از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان یا عصاره فاقد سلول آن ها، به عنوان نگهدارنده زیستی در سیستم های غذای بخصوص در سیستم های غذایی اسیدی مانند آبمیوه، بکار روند.

واژه های کلیدی: پنیر لیقوان، لاکتوباسیلوس پلانناروم، رودوتورولا موسیلوجینوسا، ضد مخمری

مقدمه

اخیراً، غذاهایی که در فرمولاسیون آن ها از نگهدارنده های شیمیایی استفاده شده، نگرانی مصرف کننده را بر می انگیزد و این نیاز را در صنعت ایجاد می کند که در جهت تولید غذاهای طبیعی و یا کمتر فراوری شده حرکت نماید. در نتیجه توجه صنعت غذا به استفاده از مواد ضد میکروبی طبیعی جلب گردیده، به همین دلیل استفاده از ضد میکروب های پپتیدی حاصل از باکتری های اسید لاکتیک (LAB) مورد توجه قرار گرفته است (Clevend et al., 2001).

بسیاری از گونه ها و سویه های موجود در طبیعت جهت حفظ موجودیت و یا موقعیت اکولوژیکی خود، سیستم های ضد میکروبی خود را در برابر عوامل عفونت زا و مهاجم توسعه داده اند. تولید پپتیدهای ضد باکتریایی بخشی از ایمنی ذاتی یا اولیه محسوب می شود که در بسیاری از گونه ها یافت می شود. پپتیدهای ضد میکروبی میزبان خود را توسط مکانیسم های مختلفی محافظت می کنند. معمولاً با ایجاد منفذ

در غشای سلول هدف، باعث نشست غیر قابل بازگشت مواد داخل سلولی و متعاقباً مرگ سلولی خواهند شد. پپتیدهای ضد میکروبی سمیت متفاوتی نشان می دهند (Nissen-Meyer & Nes, 1997).

پپتیدهایی که بصورت ریبوزومی سنتز می شوند و دارای ویژگی ضد میکروبی نیز هستند، توسط طیف گسترده ای از ارگانسیم های زنده، که شامل پروکاریوت ها تا یوکاریوت های عالی هستند، تولید می گردند. پپتیدهای ضد میکروبی که توسط ریبوزوم در باکتری ها تولید می شوند، باکتریوسین نام دارند (Papagianni, 2003).

بسیاری از میکروارگانسیم های موجود در آب میوه جات به عنوان آلوده کنندگان مواد خام یا محیطی محسوب می شوند اما تعداد معدودی از آنها می توانند در شرایط اسیدی و اکسیژن کم رشد کنند. این میکروارگانسیم ها به دلیل این که در دما و pH پایین می توانند رشد کنند، ممکن است سبب مشکلات متعددی در صنایع فوق الذکر شوند، از جمله سبب آسیب اقتصادی جدی به صنایع نوشیدنی و لبنی گردند (Crowly et al., 2012).

مخمرها، عمده ترین گروه میکروارگانسیم ها هستند که موجب فساد نوشابه های بدون الکل و آب میوه ها می شوند و در صورت رشد میکروارگانسیم ها و تولید فرآورده های متابولیکی جانبی مانند CO₂، اسید و ترکیبات فاسدکننده، فساد قابل رؤیت است (Ashurst,)

۱، ۲ و ۳ - به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۴ - استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد.

* - نویسنده مسئول: (Email: edalatian@um.ac.ir)

(2005).

مواد و روش‌ها

برای بررسی اثر ضدخمیری سویه‌های لاکتوباسیلوس پلانتروم از مراحل مختلف تولید پنیر ليقوان (شیر، دلمه، پنیر تازه ليقوان)، از ۱۹ سویه لاکتوباسیلوس پلانتروم که قبلاً 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 وارسته موسیلوجینوسا با PTCC 5257 به‌عنوان شاخص استفاده شد. جهت بررسی اثر ضدخمیری جدایه‌های مذکور در سطح محیط کشت از روش نقطه‌گذاری (Agar Spot) و برای بررسی اثر ضدخمیری مایع عاری از سلول (سوپرناتانت) جدایه‌های لاکتوباسیلوس پلانتروم 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 $10^6 \times 1-5$ کلنی مخمر در هر میلی‌لیتر می‌باشد (کمیته استانداردهای آزمایشگاه بالینی ۱۹۹۲).

آماده‌سازی سوپرناتانت فاقد سلول (CFS) Cell Free Supernatant

پس از کشت ایزوله‌های لاکتوباسیلوس پلانتروم به مدت ۲۴ ساعت در MRS برات (مرک) با دور، $950 \times g$ 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 پلانتروم یک کلونی به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت MRS برات 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 (۷۵/۰ درصد آگار) که تلقیح شده با 10^6 کلنی مخمر به ازای هر میلی‌لیتر بود، در دو دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دو تکرار قرار

مطالعات فراوانی مبنی بر تولید ترکیبات ضدباکتری به وسیله باکتری‌های اسیدلاکتیک وجود دارد. باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌توانند دامنه وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی 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 ضد میکروبی تولید شده توسط این میکروارگانیسم‌ها می‌توان به متابولیت‌های اکسیژن‌زا، استالدهید، ایزومرهای D اسیدهای آمینه، دی استیل، رتوترین، 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 پلانتروم از کلم ترش و آب چاه را بر روی استریتوکوکوس ترموفیلوس، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، پی‌سیلیوم اکسیانسوم 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 ضد میکروبی حاصله از باکتری‌های ذکر شده تاثیر ممانعت‌کنندگی قابل توجهی بر روی شاخص‌های باکتریایی و قارچی دارد.

El-Mabrok و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر ضدقارچی لاکتوباسیلوس پلانتروم ایزوله شده از میوه‌های مالزیایی را بر روی ژئوتریکوم گئوسپوریوم 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 پلانتروم API50CHL بود و اینکه سلول‌ها و سوپرناتانت‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک پتانسیل کاربرد به‌عنوان یک زیست‌نگهدارنده را بر علیه قارچ ذکر شده برای جایگزینی ضدقارچ‌های شیمیایی را دارند.

هدف اصلی این پژوهش، بررسی اثر ضدخمیری سویه‌های لاکتوباسیلوس پلانتروم جدا شده از مراحل مختلف تولید پنیر سنتی ليقوان بر روی مخمر رودوتورولا موسیلوجینوسا وارسته موسیلوجینوسا با PTCC 5257 به‌عنوان شاخص فساد آمیوه و بررسی فاکتورهای تکنولوژیکی مختلف بر روی اثر ضد میکروبی سوپرناتانت فاقد سلول این سویه‌ها، در سطح محیط کشت و یافتن موثرترین سویه مورد بررسی بر روی مخمر مزبور است.

مدت ۱۵ دقیقه (شرایط اتوکلاو) (Rouse, et al., 2008)، ۸۰ درجه سانتی‌گراد 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 سوپرناتانت‌ها، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به درون چاهک‌هایی درون محیط کشت حاوی ۱۰^۶مخمر رودوتورولا موسیلوجینوسا به ازای هر ۲۰ میلی‌لیتر از PDA ریخته شد. و پس از حدود ۱ ساعت درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۴۸ 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 جداپه‌ها

آنزیم پروتئیناز K، به سوپرناتانت فاقد سلول با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزوده شد. نمونه کنترل MRS برات 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 ضدخمیری سوپرناتانت عاری از سلول در برابر مخمر شاخص، با روش نفوذ در چاهک مورد بررسی قرار گرفت (Ghraiiri, et al., 2005).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش، داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با آزمون فاکتوریل آنالیز شدند. برای آنالیز داده‌های 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 ضدخمیری 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 قطر ۱۶ میلی‌متر و کمترین قطر هاله مربوط به نمونه LF 49 با قطر ۶ میلی‌متر می‌باشد.

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 ۱۰^۶ کلنی مخمر رودوتورولا موسیلوجینوسا به ازای هر ۲۰ 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 ضد میکروبی 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 جداپه‌ها

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 ۱۰^۶ 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 ۲۴-۴۸ ساعت قرار داده شدند. بمنظور نمونه شاهد از محیط کشت MRS برات 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 به‌صورت میانگین دو تکرار گزارش شدند.

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

جهت بررسی این تیمار از دماهای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ و ۳۰ دقیقه (Cardoso et al., 2012)، ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به

جدول ۱- نتایج اثر ضد مخمری ۱۹ سویه لاکتوباسیلوس پلانناروم ایزوله شده از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان در روش نقطه گذاری بر روی مخمر رودوتورولا موسیویجینوسا به صورت قطر هاله بازدارندگی بر حسب میلی متر

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 مخفف Curd به معنی دلمه و LF مخفف Lighvan 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 میلی متر می باشند (قطر نقطه قرار داده شده ۴ میلی متر می باشد).

باکتری اسید لاکتیک و اسیداستیک موجود در محیط کشت MRS، می باشد (Cabo, et al., 2002). ولی اثر متقابل نوع جدایه ها و دماهای مورد بررسی تفاوت معنی داری نداشتند.

بسیاری از باکتری های اسید لاکتیک، فلاوپروتئین، NADH اکسیداز و پراکسیداز دارند که توانایی تولید هیدروژن پراکسید در حضور اکسیژن را دارا می باشند. برخی از محققین فعالیت ممانعت کنندگی هیدروژن پراکسید را به اثر اکسیداسیونی قوی سلول ها و تخریب ساختار مولکول های اصلی پروتئین ها نسبت می دهند (Davidson, et al., 1983; Condon, 1987). فعالیت ممانعت کنندگی یا اسیدی کردن سیتوپلاسم نیروی حرکتی پروتئین^۱، مستقیماً بر غشا و رشد سلول های مخمر موثر هستند (Gerez, et al., 2013). پژوهشگران معتقدند که مولکول اصلی در فعالیت ضدقارچی، پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از یک کیلودالتون هستند

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

همان طور که در جدول ۱ مشاهده می شود، در حدود ۶۰ درصد جدایه ها دارای خاصیت ضد مخمری هستند. تاثیر دماهای گرمخانه گذاری ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد، روی قطر هاله ایجاد شده ناشی از اثر ضد مخمری ۱۹ جدایه لاکتوباسیلوس پلانناروم، معنی دار بود ($p < 0.05$)؛ بطوری که اکثراً در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قطر هاله بازدارندگی بیشتر از ۲۵ درجه سانتی گراد بوده است. این عامل می تواند به دلیل رشد بهتر مخمر در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نسبت به ۳۰ درجه سانتی گراد باشد و دیگر آنکه با توجه به مزوفیل بودن باکتری لاکتوباسیلوس پلانناروم، امکان رشد و تولید متابولیت توسط این باکتری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نسبت به ۲۵ درجه سانتی گراد بیشتر امکان پذیر است (Edalatian, et al., 2012). محققان، پیشنهاد کرده اند که فعالیت ضدقارچی باکتری های اسید لاکتیک، به دلیل اثر سینرژیستی اسید لاکتیک تولید شده توسط

1 Protein Motive Force

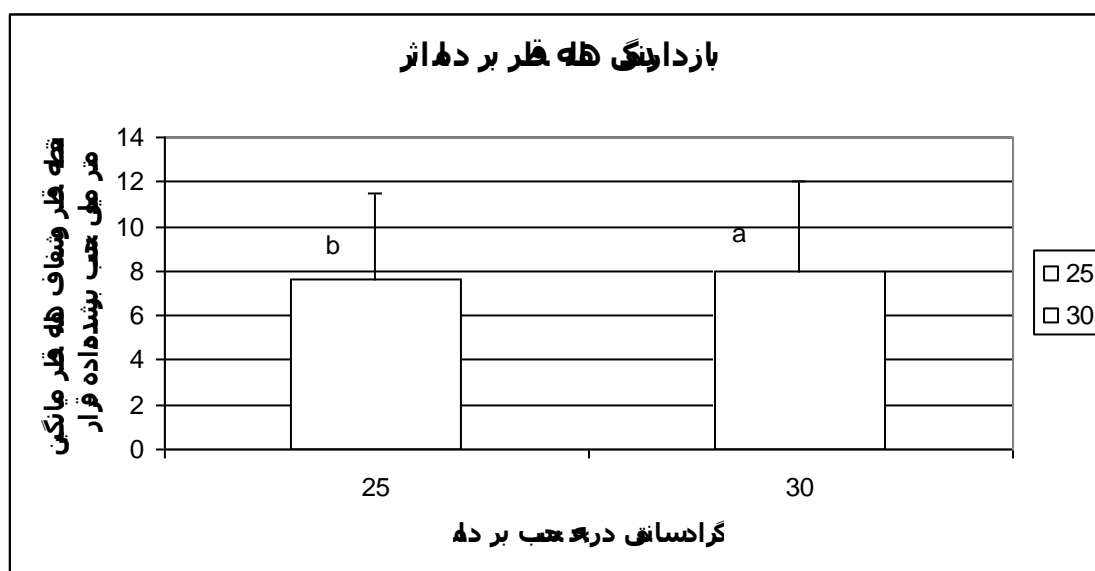
آسپرژیلوس فلاووس، رایزوپوس استولونیفر و بوتریتیس سینرا را در خیار به تاخیر می‌اندازند (El-Mabrok, et al., 2013).

خواص ضد میکروبی 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، دی‌اکسید کربن، دی‌استیل، استالیدی (Ouweland, 1998). در مورد فعالیت ضدقارچی لاکتوباسیلوس پلانتاروم، باید عنوان کرد که ترکیبات فعالی از قبیل: دی‌پپتیدهای حلقوی، هیدروکسی اسیدهای چرب، ۳- فنیل لاکتیک اسید و سایر ترکیبات با وزن مولکولی پایین عامل این خاصیت هستند (Strom 2005).

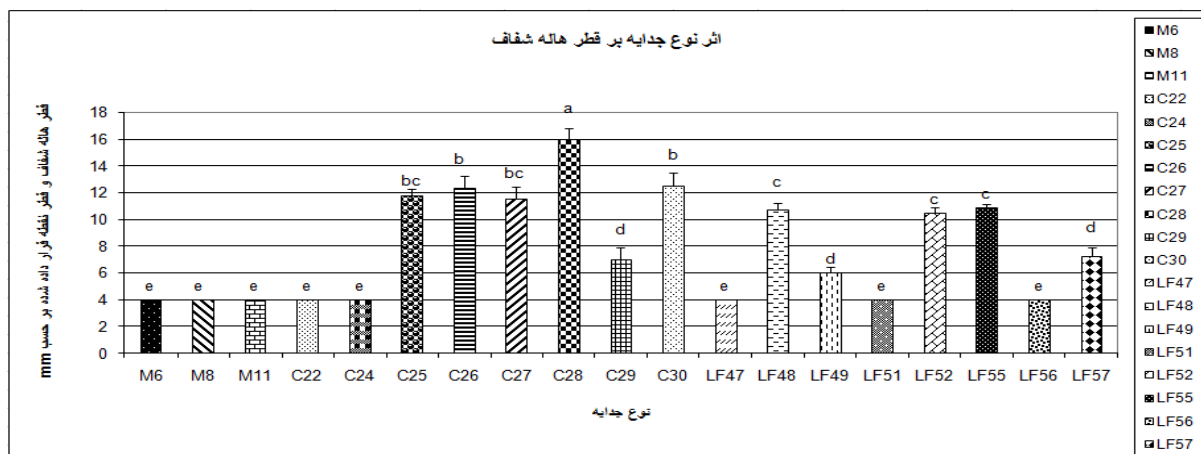
در جدول شماره ۲ نتایج مربوط به روش نفوذ در چاهک بر روی مخمر رودوتورولا موسیلوجینوسا آورده شده است. بیشترین قطر هاله مربوط به ایزوله C28 با قطر ۱۱ میلی‌متر و کمترین قطر هاله مربوط به ایزوله LF52 با قطر ۴ میلی‌متر بود.



شکل ۱- نمونه شاهد مخمر رودوتورولا موسیلوجینوسا (الف) و جدایه‌هایی که بر آن خاصیت ضد مخمری دارند (ب)



شکل ۲- تاثیر دمای گرمخانه‌گذاری مورد استفاده در روش نقطه‌گذاری بر خاصیت ضد مخمری جدایه‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم از نظر قطر هاله شفاف بر حسب میلی‌متر



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

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

حدود ۴۲ درصد جدایه‌های لاکتوباسیلوس پلاتناروم، دارای اثر بازدارندگی (هاله شفاف مشاهده شده در پلیت) بر روی مخمر

رودوتورولا موسیلوجینوسا بوده‌اند.

در روش نفوذ در چاهک که نتایج آن در جدول (۲) آمده است در

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

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

*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 مخفف Lighvan Fresh (پنیر تازه لیقوان) و M مخفف Milk (شیر) است.

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 ضد میکروبی 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 رتوترین، دی‌استیل، ایزومرهای D اسید آمینه 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 عمده‌تاً برای تولید غذا به‌عنوان نگهدارنده ضد میکروبی 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) در غشای انتقالی شده و در نهایت سبب مرگ سلول و نیز جلوگیری از جوانه‌زنی مخمر خواهد شد (Crowly, et al., 2012).

عامل دیگر خاصیت ضد میکروبی 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 ضد میکروبی را دارا می‌باشد (Sirgid, et al., 2006).

در تحقیقی که اوکازایا و همکاران (۲۰۰۵) بر خاصیت ضد مخمری 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 لاکتوباسیل‌ها در اثر فعالیت لیپولیتیک خود ممکن است تولید اسید چرب کنند، فعالیت ضدقارچی اسیدهای چرب بستگی به طول زنجیره، غلظت و pH محیط دارد. فعالیت ضد میکروبی 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 پلاتناروم 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).

همانطور که از نتایج روش نقطه‌گذاری و روش نفوذ در چاهک مشخص است در حدود ۶۰ درصد جدایه‌های لاکتوباسیلوس پلاتناروم در روش نقطه‌گذاری و ۴۲ درصد جدایه‌های لاکتوباسیلوس پلاتناروم 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 پلاتناروم 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 احتمالاً در اثر وجود خود جدایه‌ها می‌باشد. یعنی خود جدایه‌ها نیز دارای اثر بازدارندگی بر روی رشد مخمر رودوتورولا موسیلوجینوزا داشته‌اند. معمولاً در روش نقطه‌گذاری عاملی که سبب ایجاد هاله شفاف بازدارندگی می‌شود مربوط به ترکیبات ضد میکروبی وابسته به کلنی^۱ مانند اسیدهای چرب و آب اکسیژنه که مسئول ایجاد خاصیت ضد میکروبی در محیط کشت جامد یا همان نقطه‌گذاری می‌باشند (Alegria, 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 ضد مخمری مشاهده نشد، این در حالی است که ۵۰ درصد جدایه‌های مربوط به دلمه و ۵۰ درصد جدایه‌های مربوط به پنیر تازه لبقوان دارای خاصیت ضد مخمری بودند. پس می‌توان گفت که احتمالاً خاصیت ضدقارچی در حین فراوری و مراحل مختلف تولید پنیر لبقوان حاصل می‌گردد.

این عامل را می‌توان احتمالاً به دلیل اختلاف بین زیرگونه‌های مختلف باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلاتناروم 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 پلاتناروم جدا شده از مراحل مختلف تولید پنیر لبقوان با کمک روش rep-PCR مشاهده و گزارش دادند.

Sharma و همکاران (۲۰۱۳) به بررسی اثر ضد کاندیدیایی باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلاتناروم سویه ۱۱۴ پرداختند. 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

لاکتوباسیلوس پلاتناروم ایزوله شده از مراحل مختلف تولید پنیر ليقوان آورده شده است. همانطور که ملاحظه می‌گردد بیشترین تاثیر در $pH=2$ و کمترین تاثیر در $pH=7$ مشاهده گردید.

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 ضدخمیری سوپرناتانت فاقد سلول (CFS) جدایه‌های

جدول ۳- نتایج تاثیر pH های مختلف سوپرناتانت فاقد سلول ۱۹ ایزوله لاکتوباسیلوس پلاتناروم روی فعالیت ضدخمیری آنها

شماره جدایه	قطر نمونه شاهد	pH=۲	pH=۳	pH=۴	pH=۵	pH=۶	pH=۷
M6	.	3 ± 0.707^x	$2/5 \pm 0.707$
M8	.	3 ± 0.707	۳
M11	.	$3/5 \pm 0.707$	3 ± 0.707
C22	.	3 ± 0.707	$2/5 \pm 0.707$
C24	.	$3/5 \pm 0.707$	3 ± 0.707
C25	$6/25 \pm 0.353$	7 ± 0.707	$6/75 \pm 0.707$	۶/۵	6 ± 0.353	.	.
C26	$6/5 \pm 0.707$	$7/5 \pm 0.707$	7 ± 0.707	$6/25 \pm 0.353$	۶/۵	.	.
C27	.	3 ± 0.707	2 ± 0.707
C28	$10 \pm 1/414$	$14/5 \pm 0.707$	$13 \pm 1/414$	12 ± 0.707	$10/5 \pm 0.707$	6 ± 0.707	.
C29	.	3 ± 0.707	۳
C30	۸	10 ± 0.707	9 ± 0.707	$8/5 \pm 0.707$	$7/5 \pm 0.707$	۳	.
LF47	.	3 ± 0.707	$2/5 \pm 0.707$
LF48	5 ± 0.707	$7/25 \pm 0.707$	$6/5 \pm 0.707$	6 ± 0.353	$5/5 \pm 0.353$.	.
LF49	$4/5 \pm 0.707$	$6/5 \pm 0.707$	$5/5 \pm 0.707$	5 ± 0.353	$2/5 \pm 0.353$.	.
LF51	.	$2/5 \pm 0.707$	2 ± 0.707
LF52	۴	$7/5 \pm 0.707$	$6/5 \pm 0.707$	4 ± 0.707	4 ± 0.353	.	.
LF55	$5/75 \pm 0.353$	9 ± 0.707	8 ± 0.707	$6/5 \pm 0.707$	5 ± 0.707	.	.
LF56	.	$3/5 \pm 0.707$	$2/5 \pm 0.707$
LF57	.	3 ± 0.707	2 ± 0.707

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

می‌یابد، به‌طوریکه در $pH=7$ هیچ‌گونه خاصیت ضدخمیری 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 اسپرژیلوس نایجر انجام شده است، همخوانی دارد. به طوری که یافته‌های آنان نیز نشان می‌دهد که بیشترین فعالیت ضد قارچی در $pH=3-3/8$ مشاهده شد و با افزایش pH (از $3/8$ 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 جدا شده از گندم دوروم ایتالیایی بر روی کپک‌های پنسیلیوم روکوفورتی و اسپرژیلوس نایجر پرداخته بودند، مطابقت دارد، بطوری که در pH بالاتر از ۴، فعالیت ضدقارچی

نتایج تاثیر pHهای مختلف مایع عاری از سلول جدایه‌های لاکتوباسیلوس پلاتناروم بر مخمر رودوتورولا موسیلوجینوسا در جدول ۳ آورده شده است. نتایج نشان داد که بیشترین تاثیر ضدخمیری در $pH=2$ وجود دارد بطوری که حتی جدایه‌هایی که در نمونه شاهد فاقد اثر ضدخمیری بودند در ۲ و $pH=3$ خاصیت ضدخمیری از خود نشان دادند. این طور بنظر می‌رسد که بسیاری از مواد ضد میکروبی 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 پلاتناروم مراحل مختلف تولید پنیر ليقوان نسبت به pHهای متفاوت، کاملاً مشهود است که جدایه C28 در مقایسه با سایر جدایه‌ها نسبت به شرایط قلیایی مقاوم‌تر است؛ این طور بنظر می‌رسد که با افزایش pH، اثر ضدخمیری کاهش

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 ضد میکروبی موجود در سوپرناتانت باکتری لاکتوباسیلوس پلاننتاروم بر مخمر رودوتورولا موسیلوجینوسا آورده شده است.

کاهش می‌یابد (Valerio, et al., 2009). نکته قابل توجه در مورد اثر pHهای مختلف بر فعالیت ضد مخمری جدایه‌های لاکتوباسیلوس پلاننتاروم این بود که این جدایه‌ها در pHهای اسیدی که اغلب در آبمیوه‌جات مشاهده می‌شود، فعالیت ضد مخمری 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

جدول ۴- نتایج تاثیر دماهای مختلف بر روی قطر هاله بازدارندگی به‌عنوان شاخصی بر مقاومت ترکیبات ضد میکروبی موجود در سوپرناتانت فاقد سلول ۱۹ ایزوله لاکتوباسیلوس پلاننتاروم بر مخمر رودوتورولا موسیلوجینوسا بر حسب میلی‌متر

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

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

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 ضد میکروبی مایع عاری از سلول اتروکوکوس فکالیس بر روی مخمرها، قارچ‌ها و باکتری‌ها پرداختند و بیان کردند که با افزایش دما و یا افزایش زمان حرارت‌دهی، اثر ضد میکروبی 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 ضد مخمری خود را

نتایج تاثیر مایع عاری از سلول (CFE) در تیمارهای مختلف درجه حرارت بر فعالیت ضد مخمری رودوتورولا موسیلوجینوسا (جدول ۴) نشان داد که در بکارگیری دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تمامی جدایه‌ها خاصیت ضد مخمری 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 ضد میکروبی و شبه باکتریوسینی با افزایش دما و یا افزایش زمان در صورت اعمال حرارت (در این جا ۱۰۰ درجه

نبودند. می‌توان به این نتیجه رسید که ترکیبات ضدخمیری تولید شده توسط این جدایه‌ها احتمالاً 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 ضدخمیری جدایه‌های لاکتوباسیلوس پلاتناروم 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 ضدخمیری کاهش می‌یابد بطوری که بیشترین تاثیر ضدخمیری در ۲ و ۳ pH وجود داشت. با افزایش دما و یا افزایش زمان حرارت‌دهی، کاهش اثر ضدخمیری مشاهده شد، بطوری که در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه هیچ‌گونه اثر ضدخمیری مشاهده نشد. در حضور آنزیم پروتئیناز K هیچ کدام از جدایه‌ها از خود خاصیت ضدخمیری نشان ندادند.

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 ضد میکروبی موجود در سوپرناتانت فاقد سلول، از اثر آنزیم پروتئیناز K بر فعالیت ضدخمیری این جدایه‌ها استفاده گردید. همانطور که قبلاً ذکر شده بود باکتریوسین‌ها ماهیت پروتئینی دارند.

قابلیت بازدارندگی سوپرناتانت جدایه‌هایی که دارای خاصیت ضدخمیری 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

منابع

- Alegría, Á., Delgado, S., Rocés, 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 antagonistic 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.
- Cleveland, 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: Branan, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S. (Eds.), *Food Additives*. *Marcel Dekker, Inc.*, New York, pp. 1–9.
- Davidson, P.M., Post, L.S., Branan, A.L., McCurdy, A.R., 1983, Naturally occurring and miscellaneous foods antimicrobials. In: Davidson, P.M., Branan, 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 Technology*, 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 .
- Ghraiiri, 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., & Gobetti, 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 yeast 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 produced by Lactic Acid Bacteria: structures and properties,Ph.D thesis , University of Helsinki .



Study the effect of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different stages of production Lighvan cheese on *Rodotorula mucilaginosa* as a spoilage indicator in fruit juice

N. Nayyeri¹, M. R. Edalatian^{*2}, M. B. Habibi Najafi³, M. Bahreyni⁴

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 of this study was the evaluation of anti-yeast activity of *Lactobacillus plantarum* isolates from different stages of Lighvan production against *Rodotorula mucilaginosa* 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: Nineteen *Lb. plantarum* isolates, which were identified previously, were subjected to antifungal assay. For this purpose, *Rodotorula mucilaginosa* PTCC 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 Protienase 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 25°C rather than in 30°C. Also, with respect to the mesophilic nature of *Lb. plantarum* isolates, the possibility of metabolite production are more likely in 30°C. 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' CFS witnessed 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, *Lactobacillus plantarum*, anti-yeast, *Rodotorula mucilaginosa*.