Archive of SID

ارزیابی جمعیت باکتریایی و تغییرات بیوشیمیایی طی تخمیر خودبخودی سبوس گندم

حامد عزیزنیا[۱]، **مرضیه حسینی‌نژاد[۱]***، سارا ناجی طبسی[۲]، حسین زمانی[۳]

[۱] گروه زیست فناوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
[۲] گروه نانو فناوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
[۳] گروه مهندسی و طراحی ماشین‌آلات صنایع غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۳

چکیده

باکتری‌های اسید لاکتیک علاوه بر داشتن خواص سلامت‌بخش بدن، باعث بهبود خواص حسی، بافت، خواص رئولوژیکی، تغذیه‌ای و افزایش ماندگاری بسیاری از محصولات غذایی می‌گردند. خمیر ترش حاصل از تخمیر خودبخودی غلات به عنوان منبع بسیار غنی از باکتری‌های اسید لاکتیک شناخته شده است. این پژوهش با هدف بررسی جمعیت باکتریایی، شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در خمیر ترش حاصل از سبوس گندم و ارزیابی اثر فعالیت این باکتری‌ها بر ترکیبات و خصوصیات بیو شیمیایی سبوس گندم انجام گرفته است. در اثر تخمیر خودبخودی سبوس گندم میزان کربوهیدرات بیش از سایر ترکیبات سبوس گندم تغییر داشت حال آن که پروتئین و خاکستر تغییر معنی‌داری نشان نداده و چربی و فیبر به طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین طی ده روز زمان تخمیر، اسیدیته و تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک افزایش، میزان آلودگی و pH کاهش داشت که نشان‌دهنده غالب شدن فلور لاکتیکی بود. میزان اسید فیتیک طی ۶ h پس از تخمیر به یک سوم مقدار اولیه خود رسید ولی پس از گذشت ۱۲ h، ۱۸ و ۲۴ از تخمیر تفاوت معنی‌داری نداشته و میزان آن به‌ترتیب برابر ۰/۵۵، ۰/۵۰، و ۰/۴۸ درصد بر اساس وزن خشک سبوس بود. با استفاده ضریب پیرسون و روش جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی بر اساس ضریب تشابه ۸۰ درصد، جدایه‌های کوکسی‌شکل به پنج گروه و جدایه‌های با سیل شکل به هفت گروه تقسیم‌بندی و از هر گروه یک جدایه به منظور شناسایی توسط روش توالی یابی S ۱۶rRNA انتخاب شد. در نهایت باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کورواتوس*، *لاکتوباسیلوس ساکئی*، *لاکتوباسیلوس گرامینیس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لویکونوستوک سودومزوئینتریدس*، *لویکونوستوک مزوئنتریدس*، *لویکونوستوک هولزافلی*، *ویسلا کانفیوزا*، *ویسلا سیباریا*، *پدیوکوکوس اسید لاکتیسی*، *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* و *پدیوکوکوس استیلسی* به عنوان باکتری‌های اسیدلاکتیک خمیرترش سبوس گندم شناسایی شدند.

کلید واژگان: باکتری‌های اسید لاکتیک، تخمیر خودبخودی، توالی یابی، سبوس گندم

* m.hosseininezhad@rifst.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سبوس گندم با داشتن مقادیر بالای فیبر، ترکیبات ریزمغذی و زیست فعال مانند آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از ارزش تغذیه‌ای بالایی برخوردار است. مطالعات فراوانی در ارتباط با استفاده از دانه کامل غلات در رژیم غذایی و ارتباط آن با جلوگیری از ابتلا به بسیاری از بیماری‌های مزمن صورت گرفته است (۱، ۲). بافت زبر، طعم تلخ، احساس دهانی[1] نامطلوب و وجود عوامل ضد تغذیه‌ای مانند اسید فیتیک دلیل اصلی حذف یا کاهش سبوس در صنعت نانوایی بوده است. تحقیقات نشان داده است که تخمیر سبوس گندم در بهبود خواص تکنولوژیکی، حسی و تغذیه‌ای سبوس بسیار موثر بوده است (۳، ۴).

خمیر ترش حاصل از تخمیر خودبخودی غلات منبع بسیاری از باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB[2]) می‌باشد (۵). این باکتری‌ها گرم مثبت، کوکسی و باسیل مانند، غیر متحرک و غیر اسپورزا هستند. این باکتری‌ها در شرایط میکروآئروفیل بخوبی رشد می‌کنند و با تخمیر قند موجود در محیط رشد و تولید اسیدهای آلی سبب کاهش pH و افزایش اسیدیته محیط می‌گردند. این اسیدهای آلی علاوه بر ایجاد طعم، سبب جلوگیری از رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌شوند. LAB در بیشتر محصولات کشاورزی و غذایی خام رشد کرده و بخشی از فلور میکروبی طبیعی این مواد را تشکیل می‌دهند که برای رشد نیاز به منابع کربنی مانند قند و منبع خارجی حاوی اسیدهای آمینه دارند. به همین منظور با ایجاد شرایط مناسب و استفاده از فلور طبیعی موجود در این محصولات می‌توان اقدام به تخمیر خود به خودی[3] کرد. با استفاده از این نوع تخمیر، فلور طبیعی موجود در مواد خام مانند شیر و گندم رشد و تکثیر پیدا می‌کند (۶). بهبود خواص حسی، بافتی، خصوصیات رئولوژیکی و تغذیه‌ای در بسیاری از مواد غذایی حاوی LAB مشاهده شده است. همچنین این باکتری‌ها ماندگاری بسیاری از محصولات غذایی را افزایش می‌دهند (۷).

به منظور شناسایی و جداسازی LAB روش‌های مختلفی وجود دارد که به طور عمده مبتنی بر تفاوت‌های فنوتیپی و ژنتیکی می‌باشند. از انگشت نگاری الگوهای DNA[4] با استفاده از آغازگرهای مختلف و روش RAPD-PCR جهت شناسایی گونه‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها از جمله LAB استفاده شده است. بطوری که حتی برخی پژوهشگران با استفاده از این روش در سطح سویه هم موفق به شناسایی این باکتری‌ها شده‌اند (۸، ۹). فراوانی باندهای تکثیر شده توسط روش RAPD-PCR به توالی‌های خاصی از DNA الگو بر می‌گردد که آغازگر آن را شناسایی می‌کند. در نتیجه باکتری‌های مختلف در تعداد و اندازه باندهای تکثیر شده از DNA الگو متفاوت هستند (۱۰). دقت این روش نسبت به روش‌های فنوتیپی بالاتر بوده و تقریباً هم‌سطح SDS-PAGE Genotypic گزارش شده است (۱۱). دسیمو و همکاران نشان دادند که LAB جدا شده از سبوس ذرت سبب بهبود خصوصیات شیمیایی سبوس آن شده‌اند (۱۲). دوئی و همکاران با روش‌های مبتنی بر PCR به جداسازی LAB موجود در سبوس برنج پرداختند (۱۳).

نظر به اهمیت LAB از نظر تغذیه‌ای، تکنولوژیکی و اثرات سلامتی بخش آن، همچنین با توجه به این که گندم یکی از پرمصرف‌ترین محصولات کشاورزی است که ازکاربرد قابل ملاحظه ای در تولید فراورده های تخمیری بویژه محصولات نانوایی برخوردار است، در این پژوهش اثرات تخمیر بر خصوصیات بیوشیمیایی سبوس گندم ارزیابی و جمعیت LAB آن مورد بررسی و شناسایی قرار گرفته است.

مواد وروش‌ها

مواد خام

محیط‌های رشد مورد استفاده در این مطالعه MRS Broth و MRS Agar از شرکت شارلو اسپانیا، نوترینت آگار و نوترینت براث از شرکت مرک آلمان تامین شدند. مواد

1 Mouthfeel
2 Lactic Acid Bacteria
3 Spontaneous fermantation
4 DNA FingerPrinting

www.SID.ir

Archive of SID

شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش نیز از شرکت‌های داخلی و سیگما آلدریچ تهیه گردید.

نمونه‌گیری و شرایط تخمیر

گندم از شهرستان نظرآباد واقع در استان البرز نمونه برداری شد. سپس سبوس‌های با اندازه ذرات حدود ۶۰۰ µm با کمک آسیاب و الک دارای مش ۳۰ جداسازی شدند. در ادامه تخمیر خودبه‌خودی سبوس گندم (بدون افزودن استارترهای میکروبی) صورت گرفت به نحوی که فرآیند تخمیر با اختلاط سبوس و آب به‌صورت انکوباسیون در دمای ۲۰ °C و تازه‌سازی روزانه به‌منظور نگه‌داشتن میکروارگانیسم‌ها در حالت فعال انجام شد. از این نوع خمیرترش سه تکرار با شرایط یکسان توسط پاساژ دادن طی حدوداً ۱۰ روز تا رسیدن به فلور میکروبی پایدار تولید شد. در هر مرحله تازه‌سازی (یک‌بار در روز)، از ۱۰ درصد سبوس گندم تخمیر شده به‌منظور تلقیح به ۹۰ درصد سبوس گندم تخمیر نشده استفاده شد (۱۴، ۱۵).

اندازه‌گیری ترکیبات سبوس قبل و بعد از تخمیر

به منظور بررسی اثر تخمیر بر ترکیبات سبوس گندم میزان خاکستر، پروتئین، چربی، کربوهیدرات قبل و بعد از تخمیر بر اساس استاندارد جهانی AACC مشخص شد (۲۰–۱۶).

بررسی جمعیت میکروبی و جداسازی اولیه

از نمونه‌های خمیر ترش حاصل از سبوس گندم بصورت روزانه رقت‌سازی متوالی تهیه شد. سپس LAB موجود در خمیر ترش در محیط کشت MRS آگار حاوی ۰/۰۰۱ درصد سیکلوهگزامید (جهت جلوگیری از رشد قارچ‌ها) تحت شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۰ °C به مدت ۷۲ h رشد داده شد. همچنین بررسی رشد باکتری‌های غیر LAB (منشا آلودگی) در محیط کشت نوترینت آگار تحت شرایط هوازی در دمای ۲۵ °C به مدت دو روز انجام شد (۲۱).

اندازه‌گیری pH

به‌منظور آزمون‌های مربوط به اندازه‌گیری pH از دستگاه pH متر (Metrohm، سوئیس) استفاده شد (۲۲).

سنجش اسیدیته قابل تیتر

جهت اندازه‌گیری اسیدیته قابل تیتر کل (TTA)، ۱۰ g سبوس گندم تخمیر شده در ۱۰۰ mL آب مقطر مخلوط و سپس با استفاده از محلول سود ۰/۱ M تا رسیدن به pH برابر با ۸/۵ تیتراسیون صورت گرفت. در نهایت بر مبنای میزان میلی‌لیتر سود مصرفی اسیدیته کل قابل تیتر گزارش شد (۲۲).

اندازه‌گیری اسید فیتیک

میزان اسید فیتیک با استفاده از $FeCl_3$ اندازه‌گیری فسفر موجود در فیتات فریک به روش رنگ سنجی وانادومولیبدات تعیین شد(۲۲).

شناسایی سویه‌ها

مقدار ۱۰g از نمونه خمیرترش حاصل از سبوس گندم با افزودن محلول رینگر به مدت ۱۰ min در استوماچر[1] (Seward، انگلیس) همگن شده و با استفاده از محلول رینگر به نسبت ۱ به ۱۰ (۱:۱۰) رقت سازی صورت گرفت. در ادامه به‌منظور جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در خمیر ترش حاصل از سبوس گندم، رقت‌های حاصل بصورت سطحی در محیط MRS آگار حاوی ۰/۰۱ درصد سیکلوهگزامید و ۰/۰۰۲۵ درصد برموکروزول گرین کشت و در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۰ °C به مدت ۷۲ h گرم‌خانه‌گذاری شد. (۲۳). در ادامه پرگنه‌های موجود در پلیت‌ها شمارش شدند و از پلیت‌های دارای بیشترین پرگنه بر مبنای تفاوت در ویژگی‌های ریخت‌شناسی پرگنه‌ها شامل رنگ، شکل، تقعر، تحدب و سطحی و عمقی بودن آن‌ها، تعدادی پرگنه انتخاب و بر روی محیط کشت MRS آگار به منظور خالص‌سازی بیشتر کشت خطی داده شد (۲۳، ۲۴).

سویه‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی برای مراحل بعدی شناسایی توسط RAPD-PCR انتخاب (۲۵، ۲۶) و به منظور

1 Stomacher

www.SID.ir

Archive of SID

بهبود عملکرد RAPD-PCR، جدایه‌ها به دو گروه باسیل و کوکسی تقسیم شدند. از کشت تازه جدایه‌ها در محیط مایع توسط سانتریفوژ با ۸۰۰۰rpm و به مدت ۶۰S رسوب تهیه و پس از حذف سوپرناتانت، DNA ژنومی سویه‌ها توسط کیت استخراج DNA از باکتری‌های گرم مثبت مطابق دستور العمل شرکت سازنده (بیشگامان انتقال ژن، ایران) استخراج شد. در نهایت غلظت و خلوص DNA استخراج شده توسط نانودراپ (BOECO، آلمان) محاسبه گردید. در مرحله بعد، آزمون RAPD-PCR برای گروه‌های باسیل و کوکسی به طور مجزا با استفاده از پرایمر M13 با توالی نوکلئوتیدی 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3' صورت گرفت. سپس الکتروفورز ژل در ولتاژ ۸۵ V و زمان ۴۵ min انجام شد. پس از مشاهده ژل، باندهای تکرارپذیر حاصل بر اساس حضور (۱) و عدم حضور (۰) امتیازدهی و ماتریس تشابه داده‌ها بر اساس ضریب شباهت پیرسون تشکیل داده شد. دندوگرام ماتریس تشابه جدایه‌ها بر اساس روش جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی[1] (UPGMA) با استفاده از نرم افزار Gel Compar II 6.5 رسم شد. در نهایت خوشه‌بندی در سطح تشابه ۸۰ درصد انجام گردید(۲۵، ۲۷). سپس با استفاده از 16S rRNA PCR توسط پرایمرهای یونیورسال رفت P8FPL با توالی 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و برگشت P8806R با توالی 5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3' (با توالی هدف با اندازه حدود ۸۰۰bp) اقدام به تکثیر ژن ۱۶SrRNA و شناسایی جدایه‌ها با استفاده از توالی‌یابی (ماکروژن، کره جنوبی) شد. در جدول ۱ مقادیر بهینه شده و شرایط RAPD-PCR و 16S rRNA نشان داده شده است.

آنالیز آماری

نتایج حاصل از این پژوهش بر اساس طرح کاملا تصادفی در سه تکرار و با استفاده از نرم افزارهای SPSS (نسخه ۲۳) و Microsoft Office Excel (۲۰۱۳) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه اختلاف بین میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام پذیرفت.

نتایج

اندازه ذرات سبوس، ترکیبات سبوس گندم قبل و بعد از تخمیر

سبوس گندم دارای اندازه ذرات ۶۰۰µm-۴۰۰ بود. میزان خاکستر، پروتئین، چربی، کربوهیدرات به صورت درصد وزن خشک در جدول ۲ گزارش شده است.

جدول ۱. ترکیب مسترمیکس و برنامه دمایی ترموسایکلر جهت تکثیر ژن توسط RAPD-PCR و 16S rRNA

آزمون	ترکیبات ۲۵µm مسترمیکس (µm)	برنامه دمایی ترموسایکلر
RAPD-PCR	آب دیونیزه: ۹/۵ Taq Master Mix 2X: ۱۲/۵ پرایمر: ۱/۵ DNA Template: ۱/۵	۱. فعالسازی: °C ۹۴ به مدت min ۳ (یک چرخه) ۲. گسترش که شامل واسرشته‌سازی: °C ۹۴ به مدت ۳۰s؛ اتصال پرایمر: °C ۴۵ به مدت ۳۰ ثانیه؛ توسعه: °C ۷۲ به مدت min ۲ (۳۵ چرخه) ۳. گسترش نهایی: °C ۷۲ به مدت min ۱۰ (یک چرخه)
۱۶S rRNA	آب دیونیزه: ۹/۵ Taq Master Mix 2X: ۱۲/۵ پرایمر رفت و برگشت: ۱/۵ DNA Template: ۱/۵	۱. فعالسازی: °C ۹۴ به مدت min ۴ (یک چرخه) ۲. گسترش که شامل واسرشته‌سازی: °C ۹۴ به مدت s ۳۰؛ اتصال پرایمر: °C ۴۸ به مدت ۳۰ ثانیه؛ توسعه: °C ۷۲ به مدت min ۱ (۳۰ چرخه) ۳. گسترش نهایی: °C ۷۲ به مدت min ۱۰ (یک چرخه)

1 Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. pH، اسیدیته، تعداد LAB و آلودگی سبوس گندم پس از هربار تازه‌سازی

روز (تازه سازی)	LAB (log cfu/g)	آلودگی (log cfu/g)	pH	اسیدیته
۰	۵/۱۲±۰/۰۷^{g}	۶/۸۱±۰/۰۸^{b}	۶/۷±۰/۱^{a}	۳/۰±۰/۳۱^{i}
۱	۵/۹۱±۰/۰۵^{f}	۷/۰۰±۰/۰۶^{a}	۵/۳±۰/۱^{b}	۶/۲±۰/۲۹^{h}
۲	۹/۱۱±۰/۰۶^{e}	۶/۵۲±۰/۰۷^{c}	۴/۴±۰/۱^{c}	۱۱/۴±۰/۲۳^{g}
۳	۹/۴۳±۰/۰۴^{d}	۵/۴۱±۰/۰۴^{d}	۴/۲±۰/۱^{d}	۱۴/۱±۰/۱۵^{f}
۴	۹/۶۲±۰/۰۵^{c}	۵/۲۲±۰/۰۳^{e}	۴/۲±۰/۱^{d}	۱۶/۷±۰/۱۸^{e}
۵	۹/۲۰±۰/۰۷^{e}	۳/۴۰±۰/۰۳^{f}	۴/۲±۰/۱^{d}	۱۷/۵±۰/۱۶^{d}
۶	۹/۸۲±۰/۰۲^{a}	۳/۱۲±۰/۰۹^{g}	۴/۱±۰/۱^{d}	۱۷/۴±۰/۲۱^{d}
۷	۹/۸۱±۰/۰۴^{a}	۲/۷۳±۰/۰۵^{h}	۴/۲±۰/۱^{d}	۱۸/۲±۰/۱۳^{c}
۸	۹/۵۴±۰/۰۹^{cd}	کمتر از ۲	۴/۱±۰/۱^{d}	۱۸/۵±۰/۰۸^{b}
۹	۹/۷۳±۰/۰۱^{b}	کمتر از ۲	۴/۱±۰/۱^{d}	۱۸/۸±۰/۱۱^{a}
۱۰	۹/۴۲±۰/۰۴^{d}	کمتر از ۲	۴/۱±۰/۱^{d}	۱۸/۹±۰/۱۵^{a}

حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده وجود تفاوت در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p\leq۰/۰۵$) است.

جدول ۲. ترکیبات تشکیل دهنده سبوس گندم قبل و بعد از تخمیر

ترکیبات	سبوس خام (درصد)	سبوس تخمیر شده (درصد)
خاکستر	۴/۹±۰/۳^{a}	۵/۳±۰/۴^{a}
پروتئین	۱۸/۷±۰/۵^{a}	۱۹/۳±۰/۳^{a}
چربی	۵/۲±۰/۳^{b}	۸/۸±۰/۶^{a}
کربوهیدرات (غیر از فیبر)	۲۹/۵±۱/۶^{a}	۱۹/۱±۱/۱^{b}
فیبر	۴۱/۷±۰/۵^{b}	۴۷/۴±۰/۸^{a}

حروف غیر یکسان در هر ردیف نشان‌دهنده وجود تفاوت در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P\leq۰/۰۵$) است.

جمعیت میکروبی و خصوصیات بیوشیمیایی طی تخمیر

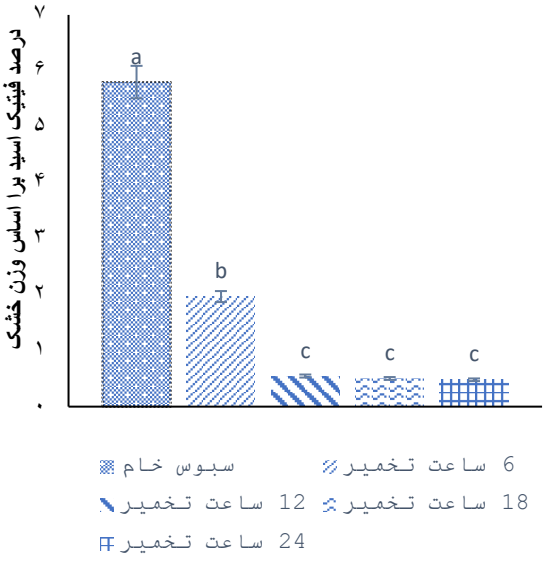
در جدول ۳ تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک، آلودگی (باکتری‌های هوازی غیر اسیدلاکتیک)، pH و اسیدیته قابل تیتر سبوس خام پس از هر بار تازه‌سازی سبوس گندم تخمیر شده تا رسیدن به فلور لاکتیکی غالب نشان داده شده است.

اثر تخمیر بر میزان اسید فیتیک سبوس گندم

شکل ۱ میزان اسید فیتیک سبوس گندم در روز دهم تخمیر سبوس در زمان h ۰، ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ تخمیر را نشان می‌دهد.کاهش معنی‌دار اسید فیتیک طی زمان تخمیر و فعالیت LAB در نمودار ۱ به طور کامل مشخص است.

شناسایی اولیه جدایه‌ها

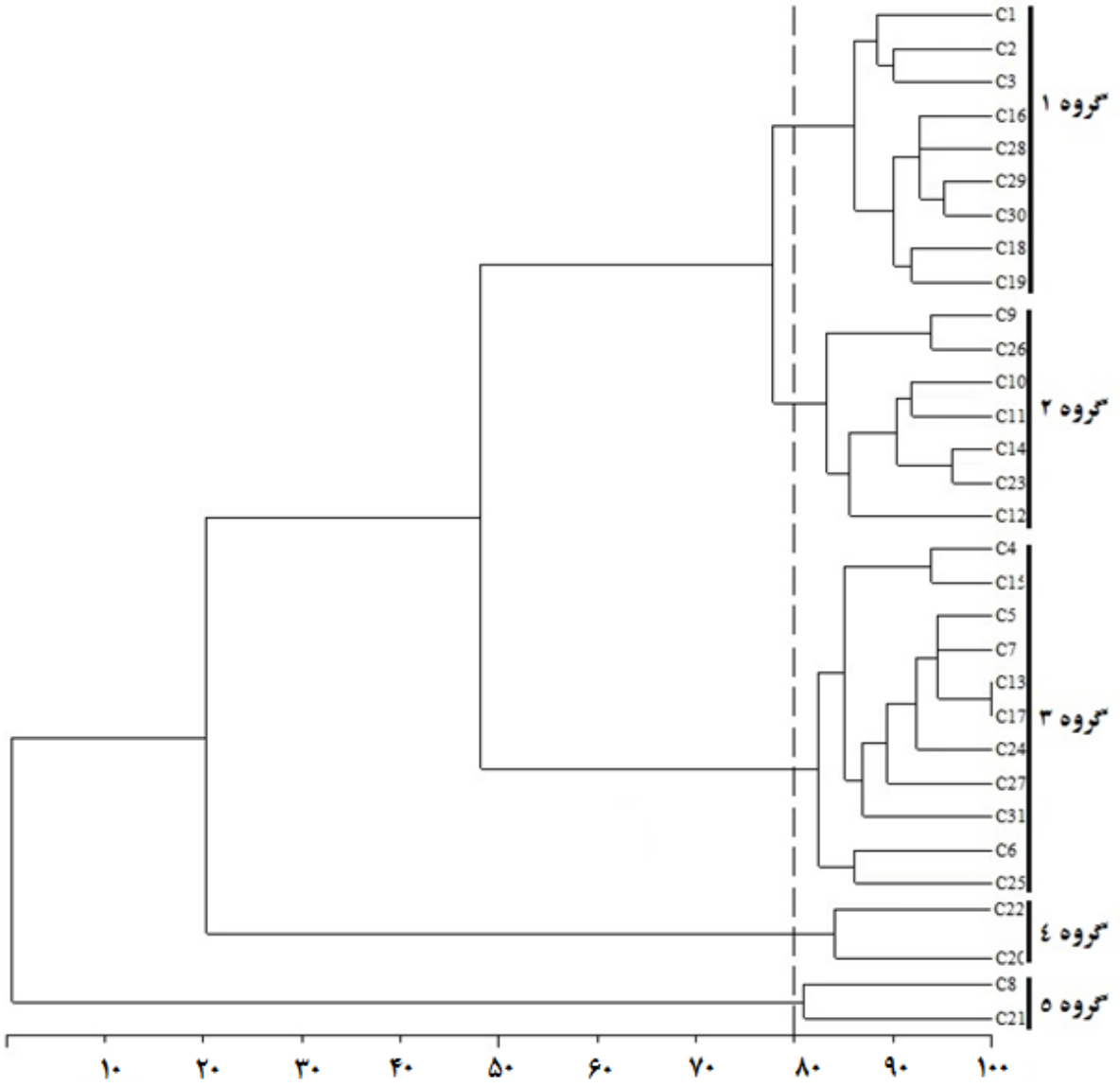
پس از بررسی کلنی جدایه‌ها از نظر خصوصیات ظاهری و رنگ‌آمیزی گرم و آزمون کاتالاز، از بین ۱۱۷ جدایه، ۷۲ جدایه‌ای که گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند به منظور مراحل شناسایی بعدی توسط آزمون RAPD-PCR به ۲ گروه کوکوسی باسیل تقسیم‌بندی شدند. دندوگرام



شکل ۱. یزان اسید فیتیک سبوس گندم در روز دهم قبل و بعد از تخمیر

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. دندوگرام UPGMA حاصل از مقایسه نتایج RAPD-PCR نمونه‌های کوکوسی توسط پرایمر M13

جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی (UPGMA) با ضریب پیرسون حاصل از مقایسه نتایج RAPD-PCR در شکل ۲ برای جدایه‌های کوکسی و در شکل ۳ برای نمونه‌های باسیل نشان داده شده است.

شناسایی جدایه‌ها با استفاده از روش تکثیر ژن S ۱۶rRNA

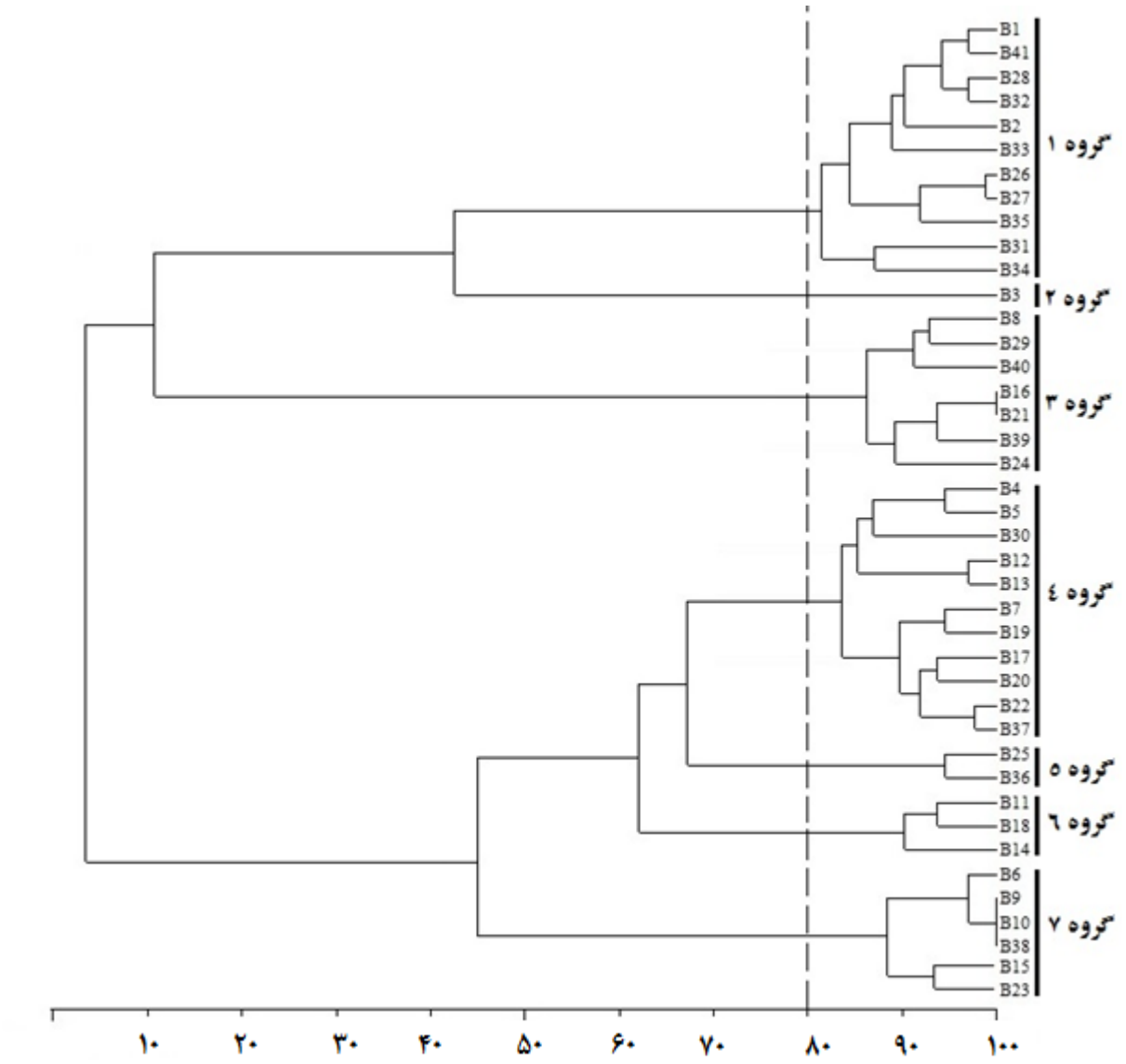
در جدول ۴ نتایج شناسایی LAB موجود در سبوس گندم با استفاده از روش تکثیر ژن ۱۶S rRNA نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

جدول شماره ۲ تغییر در ترکیبات سبوس گندم پس از تخمیر خودبخودی را نشان می‌دهد. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود، میزان کربوهیدرات پس از تخمیر به شکل معنی‌داری کاهش یافته ($p\leq ۰/۰۵$)، میزان پروتئین و خاکستر تفاوت معنی‌داری نداشت. همچنین میزان چربی و فیبر به طور معنی‌داری افزایش یافت. تغییر در میزان کربوهیدرات بیشتر از سایر ترکیبات تشکیل‌دهنده سبوس گندم بود. نتایج برخی مطالعات نشان داده است که میزان قند

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. دندوگرام UPGMA حاصل از مقایسه نتایج RAPD-PCR نمونه‌های باسیل توسط پرایمر M13

و پروتئین سبوس ذرت و برنج پس از تخمیر به صورت معنی‌دار کاهش یافته و میزان فیبر رژیمی محلول افزایش داشته است. پژوهشگران دلیل کاهش پروتئین و کربوهیدرات در سبوس ذرت پس از تخمیر را مصرف آن توسط باکتری‌ها و مخمرهای موجود در خمیر ترش و افزایش فیبر رژیمی را تولید اگزوپلی‌ساکاریدها توسط LAB عنوان کرده‌اند (۱۲، ۱۳).

بر اساس نتایج جدول ۳، از روز نخست تا روز دهم تخمیر، تعداد LAB افزایش، میزان آلودگی کاهش، pH کاهش و اسیدیته افزایش داشت. این نتایج نشان‌دهنده غالب شدن فلور لاکتیکی در خمیر ترش سبوس گندم بود. در زمان آغاز باکتری‌های اسیدلاکتیک تعداد کمتر از 10^6 CFU/g داشتند. طی تخمیر میزان باکتری‌های اسیدلاکتیک افزایش یافت و به حدود 10^9 CFU/g در روز دوم تخمیر و 10^{10}CFU/g در روز دهم تخمیر رسید. عملکرد بیوشیمیایی خمیرترش به‌طور عمده وابسته به متابولیسم باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در آن (که از آرد یا دیگر مواد تشکیل‌دهنده آن منشأ می‌گیرند) می‌باشد (۲۸). به‌طور سنتی از باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌منظور ترکیبات نگه‌دارنده

www.SID.ir

Archive of SID

طبیعی در بسیاری از مواد غذایی استفاده می‌گردد (۲۹). با توجه به جدول ۳، میزان آلودگی طی تخمیر روند کاهشی داشت بطوری که از روز هشتم تخمیر آلودگی ملاحظه نگردید. عملکرد تکنولوژیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک مانند خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی سبب نوعی ایمنی و افزایش عمر نگهداری محصول می‌شود(۷). کاهش معنی‌دار اسید فیتیک طی زمان تخمیر و فعالیت LAB در شکل ۱ به طور کامل مشخص شد. با گذشت h ۶ از تخمیر سبوس گندم، اسید فیتیک به یک سوم مقدار اولیه خود رسید. همچنین پس از گذشت h ۱۲، ۱۸ و ۲۴ از تخمیر میزان آن به‌ترتیب برابر ۰/۵۵، ۰/۵۰، و ۰/۴۸ درصد بر اساس وزن خشک سبوس بود که تفاوت معنی‌داری نداشتند. کورزتی در ارتباط با اثر تخمیر خودبخودی بر میزان اسید فیتیک در سبوس ذرت، کاهش ۵۰ درصدی اسید فیتیک پس از تخمیر را نشان داد. دلیل این امر را می‌توان فعالیت آنزیم فیتاز حاصل از مخمرها و LAB موجود در خمیر ترش ذکر کرد. فعالیت آنزیم فیتاز حاصل از این باکتری‌ها سبب تجزیه اسید فیتیک موجود در خمیر شده که در نتیجه آن دسترسی زیستی بدن به مواد معدنی موجود در نان افزایش می‌یابد (۷). سیکلوهگزامید مانع از رشد مخمرها و شرایط بی‌هوازی مانع از رشد کپک‌ها شد. کلنی های مختلف باکتری‌های تولید کننده اسید در محیط حاوی برموکروزول گرین دارای هاله سبز مایل به زرد متفاوت بود.

شناسایی باکتری های اسیدلاکتیک در روز دهم تخمیر با غالب شدن فلور لاکتیکی به صورت افزایش تعداد LAB و کاهش آلودگی صورت گرفت. دندوگرام UPGMA با ضریب پیرسون حاصل از مقایسه نتایج RAPD-PCR در شکل ۱ و۲ به ترتیب برای جدایه‌های کوکسی و نمونه‌های باسیل نشان داده شده است. به منظور انتخاب سویه‌ها برای شناسایی توسط 16S rRNA، خوشه‌بندی در سطح ۸۰ درصد تشابه صورت گرفت و بر اساس ماتریس تشابه جدایه‌های دارای بیشترین تشابه ژنتیکی در گروه یکسان قرار گرفتند. در گروه‌بندی بر اساس روش UPGMA برای دو گروه کوکسی و باسیل دو شاخه اصلی ملاحظه گردید. با استفاده ضریب پیرسون و روش جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی بر اساس ضریب تشابه ۸۰ درصد، جدایه‌های کوکسی شکل به پنج گروه و جدایه‌های باسیل شکل به هفت گروه تقسیم‌بندی شدند. به این صورت که جدایه‌های موجود در هر گروه دارای تشابه ژنتیکی بیش از ۸۰ درصد بود. به همین منظور از هر گروه یک جدایه به منظور شناسایی توسط آزمون S ۱۶rRNA انتخابو واکنش PCR برای جدایه‌های انتخاب شده در مرحله قبل، به منظور تکثیر ناحیه 16S rRNA صورت گرفت. توالی هدف حاصل از پرایمرهای یونیورسال مورد استفاده در این پژوهش طول حدود bp ۸۰۰ داشت. در جدول ۴ نتایج شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک سبوس گندم با استفاده از روش تکثیر ژن 16S rRNA نشان داده شده است. در نهایت ۴ باکتری از گونه لاکتوباسیلوس (*لاکتوباسیلوس کوروواتوس*، *لاکتوباسیلوس ساکئی*، *لاکتوباسیلوس گرامینیس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*)، ۳ باکتری از گونه لکونوستوک (*لکونوستوک سودومزوئینتریدس*، *لوکونوستوک مزوئنتریدس*، *لوکونوستوک هولزافلی*)، ۲ باکتری از گونه ویسلا (*ویسلا کانفیوزا*، *ویسلا سیباریا*) و ۳ باکتری از گونه *پدیوکوکوس* (*پدیوکوکوس اسید لاکتیسی*، *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* و *پدیوکوکوس استیلسی*) شناسایی شد. LAB متعلق به گونه‌های *لاکتوباسیلوس*، باکتری‌های اسیدلاکتیک با داشتن توان ضد میکروبی از قوی‌ترین پروکاریوت‌ها هستند. این باکتری‌ها نه تنها چندین ترکیب ضد میکروبی در چرخه کربن خود تولید می‌کنند، بلکه با مصرف سریع مواد مغذی موجود در محیط و اسیدی کردن آن با سایر گونه‌ها به رقابت می‌پردازند. برخی از گونه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک توان تولید ترکیبات ضد میکروبی با استفاده از مسیرهای متابولیکی ثانویه را نیز دارا هستند. باکتریوسین‌ها (مانند

www.SID.ir

Archive of SID

نایسین)، آنتی‌بیوتیک‌ها و ملکول‌های کوچک مشابه ترکیبات آنتی بیوتیک از این موارد می‌باشند (۳۰). برخی از این سویه‌ها قابلیت تولید اگزوپلی‌ساکاریدهای مختلف دارند (۳۱). یکی از این سویه‌های تولید کننده اگزوپلی‌ساکارید، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* سویه (NR104573.1) بوده است که سبب بهبود خصوصیات کیفی نان حجیم طی نگهداری شده است (۳۲). تاکنون چندین سویه مختلف از باکتری‌های اسیدلاکتیک متعلق به گونه‌های *لاکتوباسیلوس*، *لکونستوک*، *ویسلا* و *پدیوکوکوس* در خمیرترش مختلف حاصل از انواع گندم و دیگر غلات با خواص مختلف مشاهده شده است (۲۸). در یک مطالعه با استفاده از روش مشابه، موفق به جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک نمک دوست موجود در زیتون شدند (۳۳). با استفاده از روش‌های توالی‌یابی با بازدهی بالا و DGGE، لی‌یو و همکاران LAB موجود در یک غذای تخمیری چین بر پایه غلات را استخراج کردند. عمده باکتری‌های جداسازی شده در مطالعه آن‌ها از جنس ویسلا، لاکتوباسیلوس و لاکتوکوکوس بودند (۳۴). LAB جداسازی شده از شیر لخته شده توسط کارا و همکاران فعالیت بالای ضدمیکروبی علیه کپک‌ها و باکتری‌های پاتوژن نشان دادند (۳۵).

چنانچه عنوان گردید مواد غذایی حاصل از تخمیر خودبه‌خودی مانند خمیرترش طیف گسترده‌ای از باکتری های اسیدلاکتیک را در بر دارند. این باکتری‌ها توان ایجاد خصوصیات تکنولوژیکی و عملگرایی بالایی داشته و همچنین منابع مهمی از باکتری‌های پروبیوتیک محسوب می‌شوند. فاکتورهای مطلوب تکنولوژیکی در فرآیند تخمیر عبارت‌اند از رشد باکتری‌ها و میزان اسیدیته ایجادشده توسط آن‌ها، تولید ترکیبات ضد میکروبی، فعالیت ضد قارچی و تولید اگزوپلی ساکاریدها. همچنین تجزیه عوامل ضد تغذیه ای در محصولات تخمیری و همچنین افزایش دسترسی بدن به ترکیبات عملگرای مختلف از اهمیت بسزایی برخوردار است (۳، ۳۶). در این پژوهش سعی بر آن شد که با بهره‌گیری از روش‌های نوین به بررسی فلور باکتریایی و شناسایی LAB موجود در سبوس گندم کشت شده در ایران پرداخته و همچنین اثرات بیوشیمیایی تخمیر بر سبوس گندم بررسی گردد. امید است این پژوهش با توجه به اهمیت روزافزون باکتری‌های اسیدلاکتیک گامی در جهت اعتلای شناخت هرچه بهتر آن‌ها برداشته باشد.

منابع

1. McKeown NM, Jacques PF, Seal CJ, de Vries J, Jonnalagadda SS, Clemens R, Webb D, Murphy LA, van Klinken JW, Topping D, Murray R. Whole grains and health: from theory to practice—highlights of the Grains for Health Foundation's Whole Grains Summit 2012. The Journal of Nutrition. 2013 Mar 20;143(5):744S-58S.

2. Fardet A. New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre. Nutrition Research Reviews. 2010 Jun;23(1):65-134.

3. Coda R, Kärki I, Nordlund E, Heiniö RL, Poutanen K, Katina K. Influence of particle size on bioprocess induced changes on technological functionality of wheat bran. Food Microbiology. 2014 Feb 1;37:69-77.

4. Katina K, Laitila A, Juvonen R, Liukkonen KH, Kariluoto S, Piironen V, Landberg R, Åman P, Poutanen K. Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. Food Microbiology. 2007 Apr 1;24(2):175-86.

5. Gobbetti M, Rizzello CG, Di Cagno R, De Angelis M. How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. Food Microbiology. 2014 Feb 1;37:30-40.

6. Madigan, MT, Martinko, JM, Parker, J. Brock biology of microorganisms (Vol. 11). Upper Saddle River. 1997: Prentice hall, Inc.

7. Corsetti A, Settanni L. Lactobacilli in sourdough fermentation. Food Research International. 2007 Jun 1;40(5):539-58.

8. Tilsala-Timisjärvi A, Alatossava T. Strain-Specific Identification of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* with Randomly Amplified Polymorphic DNA-

www.SID.ir

Archive of SID

19. AACC International. Approved Methods of Analysis. Method 46-12.01. Crude protein—Kjeldahl method, boric acid modification. Approved October 8, 1976; reapproved November 3, 1999. AACC International: St. Paul, MN.
20. De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 2007;13(4):194-9.

21. Faridi HA, Finney PL, Rubenthaler GL. Effect of soda leavening on phytic acid content and physical characteristics of Middle Eastern breads. Journal of Food Science. 1983 Nov;48(6):1654-8.

22. Darukaradhya J, Phillips M, Kailasapathy K. Selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., starter lactic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria from Cheddar cheese. International Dairy Journal. 2006 May 1;16(5):439-45.

23. Gerez CL, Torino MI, Rollán G, de Valdez GF. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. Food Control. 2009 Feb 1;20(2):144-8.

24. Hosseini SV, Arlindo S, Böhme K, Fernández-No C, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. Journal of Applied Microbiology. 2009 Oct;107(4):1392-403.

25. Hassan YI, Bullerman LB. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei ssp*. tolerance isolated from a sourdough bread culture. International Journal of Food Microbiology. 2008 Jan 15;121(1):112-5.

26. Andrighetto C, Psomas E, Tzanetakis N, Suzzi G, Lombardi A. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. Letters in Applied Microbiology. 2000 Jan;30(1):5-9.

27. De Vuyst L, Neysens P. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. Trends in Food Science and Technology. 2005 Jan 1;16(1-3):43-56.

28. Bartkiene E, Bartkevics V, Pugajeva I, Krungleviciute V, Mayrhofer S, Domig K. The contribution of *P. acidilactici*, *L. plantarum*, and *L. curvatus* starters and L-(+)-lactic acid to the acrylamide content and quality parameters of mixed rye-Wheat bread. LWT. 2017 Jul 1;80:43-50.

29. Toplaghaltsyan A, Bazukyan I, Trchounian A. The effects of different carbon sources on the antifungal Derived PCR Primers. Applied and Environmental Microbiology. 1998 Dec 1:64(12):4816-9.

9. Rodas AM, Ferrer S, Pardo I. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2005 Jan 1;55(1):197-207.

10. Welsh J, Rampino N, McClelland M, Perucho M. Nucleic acid fingerprinting by PCR-based methods: applications to problems in aging and mutagenesis. Mutation Research/DNAging. 1995 Oct 1;338(1-6):215-29.

11. Reuter G, Klein G, Goldberg M. Identification of probiotic cultures in food samples. Food Research International. 2002 Jan 1;35(2-3):117-24.

12. Decimo M, Quattrini M, Ricci G, Fortina MG, Brasca M, Silvetti T, Manini F, Erba D, Criscuoli F, Casiraghi MC. Evaluation of microbial consortia and chemical changes in spontaneous maize bran fermentation. AMB Express. 2017 Dec;7(1):205.

13. Doi K, Phuong OT, Kawatou F, Nagayoshi Y, Fujino Y, Ohshima T. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented rice bran product. Advances in Microbiology. 2013 Jun 25;3(03):265.

14. Meroth CB, Walter J, Hertel C, Brandt MJ, Hammes WP. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. 2003 Jan 1;69(1):475-82.

15. AACC International. Approved Methods of Analysis. Method 08-01.01. Ash—Basic method. Approved April 13, 1961; reapproved November 3, 1999.

16. AACC International. Approved Methods of Analysis. Method 30-10.01. Crude fat in flour, bread, and baked cereal products not containing fruit. Approved April 13, 1961; reapproved November 3, 1999.

17. AACC International. Approved Methods of Analysis. Method 32-07.01. Soluble, insoluble, and total dietary fiber in foods and food products. Approved October 16, 1991; reapproved November 3, 1999.

18. AACC International. Approved Methods of Analysis. Method 44-15.02. Moisture— Air-oven methods. Approved October 30, 1975; reapproved November 3, 1999.

www.SID.ir

Archive of SID

activity by lactic acid bacteria. Current Microbiology. 2017 Feb 1;74(2):168-74.

30. Abedfar A, Hosseininezhad M, Sadeghi A, Raeisi M, Feizy J. Investigation on "spontaneous fermentation" and the productivity of microbial exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from wheat bran sourdough. LWT. 2018 Oct 1;96:686-93.

31. Abedfar A, Hosseininezhad M, Corsetti A. Effect of wheat bran sourdough with exopolysaccharide producing Lactobacillus plantarum (NR_104573. 1) on quality of pan bread during shelf life. LWT. 2019 Aug 1;111:158-66.

32. Yalçınkaya S, Kılıç GB. Isolation, identification and determination of technological properties of the halophilic lactic acid bacteria isolated from table olives. Journal of Food Science and Technology. 2019 Apr 1;56(4):2027-37.

33. Liu Z, Peng Z, Huang T, Guan Q, Li J, Xie M, Xiong T. Bacterial community dynamics and physicochemical characteristics in natural fermentation of jiang-shui, a traditional food made in northwest China. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2019 Jan 4.

34. Kara Ali M, Kacem Chaouche N. Isolation of Lactobacillus strain from curdled milk and investigation of their antimycotoxinogen activity. Journal of Food Processing and Preservation. 2019:e13841.

36. Manini F, Brasca M, Plumed-Ferrer C, Morandi S, Erba D, Casiraghi MC. Study of the chemical changes and evolution of microbiota during sourdoughlike fermentation of wheat bran. Cereal Chemistry. 2014 Jul;91(4):342-9.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of Bacterial Flora and Biochemical Changes during Spontaneous Wheat Bran Fermentation

Hamed Aziznia[1], **Marzieh Hosseininezhad**[*1], Sara Naji-Tabasi[2], Hossain Zamani[3]

[1] Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran
[2] Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran
[3] Department of Food Machineries, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran

Abstract

In the poultry industry, additives such as antibiotics are used to increase performance and reduce mortality. In recent years, probiotics are used in poultry nutrition due to their beneficial effects on production and absence in carcasses. In the poultry industry, *Bacillus* spp. probiotics are used to help increase feed intake and reduce the risk of *salmonella* infection. The purpose of this study was to isolate native probiotic strains with these abilities. In this research, 25 samples from freshly feces from 7 poultry and 16 samples from 3 rice field regions of Golestan province were collected. After isolation of *Bacillus* spp. on nutrient agar, their probiotic characteristics such as enzyme production, bile salt, acid, pepsin, trypsin and antibiotic resistance, and the ability of attachment to intestinal epithelial cells and inhibit *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion were evaluated. The selected strain was identified by polymerase chain reaction (PCR) and 16S rDNA sequence. Top strain was identified as *Bacillus tequilensis*, which showed the highest binding to epithelial cells of the intestine and prevented the binding of *Salmonella* spp. This strain can improve the quality of poultry as a chicken diet and reduce the incidence of salmonellosis in chickens and humans, which, if this is achieved, will be a step towards consumer health. Considering the results obtained in this project, it is hoped to produce native probiotic for the prevention of *Salmonella* infection in Iran.

Keywords: *Bacillus*, Poultry flora, Probiotic, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

* m.hosseininezhad@rifst.ac.ir

www.SID.ir