مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره چهارم (پیاپی ۲۹) پاییز ۱۳۹۵
صفحات ۳۳۶-۳۲۶

Original Article

شناسایی مولکولی و ارزیابی خواص ضد باکتریایی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جدا شده از خمیرترش آرد کامل جو

علیرضا صادقی*[۱]، مجتبی رئیسی[۲]، مریم ابراهیمی[۳]، بلال صادقی[۴]

[۱] استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، [۲] استادیار، مرکز تحقیقات سلامت غلات، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، [۳] دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، [۴] استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان.

چکیده

سابقه و هدف: همواره شناسایی و تعیین ویژگی های جدایه های لاکتیکی زیست بوم هایی که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته اند احتمال مواجهه با باکتری های دارای قابلیت های منحصر به فرد را در پی داشته است. این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی و ارزیابی خواص ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش آرد جو انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی پس از تهیه خمیرترش از آرد کامل جو، باکتری اسید لاکتیک غالب آن جداسازی گردید. در ادامه، جدایه لاکتیکی با توالی یابی محصولات PCR، شناسایی شد و ویژگی های ضد باکتریایی آن و پالیده کشت خام و خنثی شده فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه یاد شده به ترتیب بر اساس روش های انتشار چاهک و میکرودایلوشن در برابر برخی از شاخص های باکتریایی غذازاد مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: توالی یابی محصولات PCR، موجب شناسایی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* به عنوان جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش آرد جو شد. این جدایه از بین شاخص های باکتریایی مورد مطالعه، به شکل معنی داری ($P<0/05$) دارای اثر آنتاگونیستی بیشتری نسبت به *لیستریا مونوسیتوژنز* بود. علاوه بر این، پالیده خام حاصل از فاز رشد لگاریتمی جدایه یاد شده نسبت به سایر پالیده ها از فعالیت باکتریوسینی و همچنین تاثیر ضد باکتریایی بیشتری بر روی شاخص های باکتریایی غذازاد برخوردار بود.

نتیجه گیری: *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جدا شده از خمیرترش آرد جو و پالیده های کشت آن دارای خاصیت بازدارندگی مناسبی در برابر شاخص های باکتریایی غذازاد مورد مطالعه بود. بنابراین می توان از این جدایه به عنوان کشت آغازگر و یا کشت همراه در فرآوری محصولات غذایی تخمیری به جای نگهدارنده های شیمیایی و آنتی بیوتیک های سنتزی با هدف بهبود ماندگاری و ارتقاء سلامت این فراورده ها استفاده نمود.

واژگان کلیدی: خمیرترش آرد جو، *پدیوکوکوس پنتازاسئوس*، خواص ضد باکتریایی، پالیده کشت.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۵

مقدمه

هر چند خمیرترش یک مخلوط تخمیر شده از آب و آرد است، اما مواد خام مختلف و روش‌های محلّی رایج مختص به هر کشور منجر به ایجاد یک تنوّع غیر قابل مدیریت از انواع خمیرترش در سراسر جهان گردیده‌است. به دلیل طبیعت ماده خام، تخمیر خمیرترش در مقایسه با برخی از تخمیرهای غذایی تحت شرایط غیر اسپتیک صورت می‌گیرد. با این وجود، بسته به شرایط تخمیر (زمان یا دما) و همچنین نوع آرد مصرفی (گندم، چاودار و یا سایر غلات) هر خمیرترشی ممکن است به

*) آدرس برای مکاتبه: گرگان، پردیس دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گروه علوم و صنایع غذایی. تلفن: ۰۹۱۵۵۰۸۰۳۸۳ پست الکترونیک: sadeghi.gau@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

عنوان یک اکوسیستم ویژه در نظر گرفته شود که ترکیب فلور میکروبی آن به لحاظ تعداد سلول‌ها، تنوّع و ترکیب نژادی برای یک دوره زمانی نسبتا طولانی، تقریبا پایدار باقی می‌ماند. در اکثر انواع خمیرترش، به لحاظ عددی یک گستره ویژه از باکتری‌های اسید لاکتیک تطابق یافته، غالب می‌شوند که با تعداد بیشتر از 10^8 واحد تشکیل دهنده پرگنه (CFU) در هر گرم وجود دارند. ویژگی‌های منحصر به فرد خمیرترش نظیر خصوصیات ضد میکروبی و ضد بیاتی نیز به فلور لاکتیکی غالب موجود در آن نسبت داده می‌شود (۱ و ۲).

قابلیت باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در خمیرترش به عنوان نگهدارنده‌های زیستی و جایگزینی مناسب برای نگهدارنده‌های شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی جهت ممانعت از فساد میکروبی فراورده‌های نانوایی و یا سایر محصولات غذایی، محرز گردیده است (۳ و ٤).

اثر ضد میکروبی این باکتری‌های اسید لاکتیک به واسطه تولید اسیدهای آلی و مواد دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشد. متابولیت‌های ضد میکروبی این آغازگرها شامل باکتریوسین‌ها یا ترکیبات با وزن مولکولی پایین هستند که گستره فعالیت وسیعی در برابر باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها دارند. امروزه تمایل به استفاده از خمیرترش به عنوان یک نگهدارنده‌زیستی، رو به افزایش است. زیرا فلور میکروبی آن نه تنها مانع از فعالیت میکروارگانیسم‌های مولّد فساد می‌شوند، بلکه قابلیت بهبود ارزش تغذیه‌ای و ایجاد خواص سلامتی‌بخش را نیز دارند (۵ و ٦).

بررسی بسیاری از خمیرترش‌های محلّی در طی سال‌های اخیر منجر به توصیف چندین گونه لاکتیکی جدید شده است که پیش از این نقش آنها در تخمیرهای مرتبط، اکثرا نامشخص باقی مانده بود. محققان مختلفی نیز تاثیر ضد باکتریایی جدایه‌های لاکتیکی خمیرترش را مورد بررسی قرار داده‌اند. برای نمونه، تودورو (Todorov) و همکاران در سال ۱۹۹۹ ترکیبات ضد باکتریایی تولیدی توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) جدا شده از خمیرترش را شناسایی و خصوصیات آن را تعیین کردند (۷).

مسنز (Messens) و دویوست (De Vuyst) نیز در سال ۲۰۰۲ در یک مطالعه مروری جامع به بررسی ترکیبات ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌های موجود در خمیرترش پرداختند (۳).

کاتینا (Katina) و همکاران در سال ۲۰۰۲ توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در خمیرترش را جهت ممانعت از رشد باسیلوس‌های مولّد روپینس (فساد طنابی نان) بررسی نمودند (۸). پپه (Pepe) و همکاران نیز در سال ۲۰۰۳ روش‌های کنترل این باسیلوس‌ها را توسط باکتری‌های اسید لاکتیک معرفی نموده‌اند (۹).

لروی (Leroy) و همکاران در سال ۲۰۰٦ تاثیر محتوای کربوهیدراتی در حین تخمیر خمیرترش را در بهبود رشد و تولید باکتریوسین توسط *لاکتوباسیلوس آمیلووروس* (*Lactobacillus amylovorus*) بررسی کردند (۱۰).

منتس (Mentes) و همکاران در سال ۲۰۰۷ فعالیت ممانعتی دو سویه *لاکتوباسیلوس* جدا شده از خمیرترش را در برابر *باسیلوس*‌های مولّد روپینس مورد مطالعه قرار دادند (۱۱). همچنین کرستی (Corsetti) و همکاران در سال ۲۰۰۸ قابلیت باکتریوسینی باکتری‌های اسید لاکتیک مرتبط با گندم و آردهای نامتعارف را بررسی نمودند (۱۲).

علیزاده (Alizadeh) و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز با بررسی اثر ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس کازئی* (*Lactobacillus casei*) و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (*Lactobacillus fermentum*) جدا شده از خمیرترش ایرانی در برابر چند باکتری بیماری‌زای شایع به روش انتشار چاهک و نقطه‌گذاری دریافتند که هر دو لاکتوباسیلوس مورد مطالعه از ویژگی ضد میکروبی قابل توجهی برخوردار هستند (۱۳). تا کنون مطالعات بسیار محدودی برای تعیین آغازگرهای لاکتیکی خمیرترش آرد جو صورت گرفته است (۱٤ و ۱۵) که لزوم انجام پژوهش‌های بیشتر در این زمینه را نشان می‌دهد.

هدف از انجام این پژوهش شناسایی آغازگر لاکتیکی غالب موجود در خمیرترش حاصل از آرد کامل جو با استفاده از PCR دارای پرایمر اختصاصی و متعاقبا تعیین قابلیت ضد باکتریایی جدایه یاد شده و پالیده‌های خام و خنثی شده حاصل

Archive of SID

www.SID.ir

از فازهای رشد لگاریتمی و سکون آن در برابر برخی از شاخص‌های میکروبی غذازاد بود.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹٤ و در آزمایشگاه های میکروب شناسی دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و همچنین معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی گلستان در دو بخش انجام شد. در بخش نخست، پس از تهیه خمیرترش آرد جو، باکتری اسید لاکتیک غالب آن، جداسازی و به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) مبتنی بر پرایمر اختصاصی شناسایی شد. در بخش دوم، ویژگی‌های ضد باکتریایی جدایه یاد شده در برابر *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli* PTCC 1399)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus* PTCC 1112)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes* PTCC 1298) و *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis* PTCC 1720) مورد بررسی قرار گرفت.

الف) تهیه خمیرترش آرد کامل جو به منظور جداسازی باکتری اسید لاکتیک غالب: در این پژوهش پس از تعیین درصد کربوهیدرات (٦١/٧)، درصد پروتئین (١١/٦) و درصد خاکستر (١/٩) آرد جوی پوشینه‌دار مصرفی (مخلوطی از چند رقم جو و تهیه شده از بازار محلّی) بر اساس روش‌های مدوّن AACC با شماره آزمون‌های ٢١-٣٩ کربوهیدرات، ١٠-٤٦ پروتئین و ٠١-٠٨ خاکستر بر اساس وزن خشک از آن خمیرترش تهیه گردید (١٦). برای شروع تخمیر تصادفی این خمیرترش، ٦٠ گرم از آرد جو با ٢١٠ میلی‌لیتر آب استریل، مخلوط (بازده خمیر ٤٥٠ درصد) و سپس در دمای ٣٢ درجه سلیسیوس به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. برای دستیابی به جدایه لاکتیکی غالب این خمیرترش، تخمیر در روزهای بعد با افزودن ٢٠ درصد وزنی از خمیرترش روز قبل (مایه‌گیری) به مخلوط آب و آرد جو در شرایط تخمیر که در بالا آورده شده است و تعیین مقدار اسیدیته قابل تیتر در هر روز تداوم یافت (١٤ و ١٥). برای تعیین اسیدیته قابل تیتر خمیرترش (بر حسب اسید لاکتیک)، معادل ١٠ گرم از خمیرترش آرد جو با ٩٠ میلی‌لیتر آب مقطر، مخلوط و یکنواخت شد. سپس مخلوط یاد شده توسط NaOH با نرمالیته ٠/١ تا pH معادل ٨/٥ تیتر شد و اسیدیته بر حسب میلی‌لیتر NaOH مصرفی گزارش گردید (٨).

ب) جداسازی و شناسایی باکتری اسید لاکتیک غالب خمیرترش آرد کامل جو: با حصول اطمینان از غالب شدن فلور لاکتیکی در تخمیر خمیرترش (عدم تغییر فاحش مقدار اسیدیته قابل تیتر در دو فرایند مایه‌گیری متوالی)، از تک پرگنه خالص جدایه لاکتیکی حاصل از کشت خطی سوسپانسیون میکروبی خمیرترش آرد کامل جو در محیط کشت MRS Agar (مرک، آلمان)، پس از شناسایی اولیه با استفاده از آزمون‌های کاتالاز و رنگ آمیزی گرم، DNA استخراج (بیونیر، AccuPrep K-3032، کره جنوبی) شد (٨). به منظور تکثیر توالی هدف از پرایمرهای اختصاصی باکتری‌های اسید لاکتیک با توالی F: 5'-GAACGCGAAGAACCTTAC-3' و R: 5'-GCGTGTGTACAAGACCC-3' استفاده شد (١٧). واکنش PCR در حجم نهایی ٥٠ میکرو لیتر، شامل یک واحد بافر استاندارد PCR، ٢٥ پیکومول از هر پرایمر، مخلوطی از هر dNTP با غلظت ٠/٢ میلی مولار، ٢٥ میکروگرم سرم آلبومین، آنزیم Taq پلی مراز با فعالیت ٢/٥ واحد (روبوست، فرانسه) و ٢ میکرو لیتر DNA با غلظت ١٠٠ نانوگرم انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (کوربت، مدل CG1-96، استرالیا) با شرایط دمایی ٢ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ٩٤ درجه سلیسیوس و در ادامه ٣٥ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ٩٤ درجه سلیسیوس به مدت ٣٠ ثانیه، اتصال در دمای ٦١ درجه سلیسیوس به مدت ٦٠ ثانیه، گسترش در دمای ٧٢ درجه سلیسیوس به مدت ٦٠ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ٧٢ درجه سلیسیوس به مدت ٥ دقیقه انجام شد. محصولات PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ١ درصد با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفتند (١٧). محصولات PCR برای توالی‌یابی به شرکت MWG، آلمان ارسال گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

ج) تعیین فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه لاکتیکی: برای این منظور، مقادیر دانسیته نوری کشت مایع جدایه لاکتیکی در فواصل زمانی یک ساعته در طول موج ۶۰۰ نانومتر تا رسیدن منحنی رشد به فاز سکون توسط اسپکتروفوتومتر (PG اینسترومنتز، مدل LTD T80، انگلستان) خوانده شد (۱۸).

د) تهیه پالیده‌های خام و خنثی شده از کشت جدایه لاکتیکی: برای تهیه پالیده خام کشت فاقد سلول جدایه لاکتیکی، پس از سانتریفیوژ (هرمل، مدل Z-323K، آلمان) محیط کشت مایع تهیه شده از فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه مذکور در ٤ درجه سلیسیوس با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، روماند از فیلتر سرنگی استریل ۰/۲۲ میکرومتری (بیوفیل، چین) عبور داده شد. برای تهیه پالیده خنثی شده نیز ابتدا pH روماند با استفاده از NaOH یک مولار به pH معادل ٦ رسانده شد و سپس مجددا از فیلتر مشابه مرحله قبل استفاده گردید (۱۹ و ۲۰).

ذ) تعیین فعالیت باکتریوسینی پالیده‌های کشت جدایه لاکتیکی: ابتدا پالیده‌های کشت جدایه لاکتیکی با بافر فسفات به رقت‌های مختلف (۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۱۵ و ۱/۲۰) رسانده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت به درون چاهک‌های ایجاد شده در پلیت حاوی کشت سطحی هر یک از شاخص‌های باکتریایی تزریق گردید. پلیت‌های یاد شده به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳٦ درجه سلیسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری، فعالیت باکتریوسینی بر حسب AU/ml گزارش گردید که در آن هر واحد AU معادل معکوس بیشترین رقتی بود که هاله عدم رشد واضحی ایجاد نمود (۲۰ و ۲۱).

ر) ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی و پالیده‌های حاصل از کشت آن: برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی ابتدا به روش انتشار چاهک، فعالیت آنتاگونیستی آن با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *باسیلوس سوبتیلیس* به عنوان شاخص‌های باکتریایی غذازاد (Foodborne indicator bacteria) تعیین گردید. بدین منظور پس از فعال‌سازی این شاخص‌های باکتریایی در محیط کشت Nutrient Broth (مرک، آلمان)، مقدار ٤۰ میکرولیتر از کشت فعال جدایه لاکتیکی (حاوی 10^8 CFU/ml) به چاهک ایجاد شده در مرکز پلیت حاوی کشت سطحی هر یک از شاخص‌های باکتریایی افزوده شد (۲۰ و ۲۲). سپس به منظور ارزیابی خاصیت ضد میکروبی پالیده کشت جدایه لاکتیکی در برابر شاخص‌های باکتریایی مورد مطالعه از روش میکرودایلوشن (ریز رقت) استفاده گردید. بدین منظور ۱۸۵ میکرولیتر از پالیده کشت جدایه لاکتیکی به همراه ۱۵ میکرولیتر از هر شاخص باکتریایی مورد مطالعه به طور جداگانه (حاوی 10^5 CFU/ml) به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه‌ای الایزا (بیوفیل، چین) اضافه شد. در ادامه و پس از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳٦ درجه سلیسیوس، جذب نمونه یاد شده در طول موج ٦۰۰ نانومتر تعیین گردید. نمونه کنترل مثبت در این آزمون، فاقد پالیده کشت جدایه لاکتیکی و نمونه کنترل منفی، حاوی شاخص باکتریایی اتوکلاو شده بود (۱۹ و ۲۲).

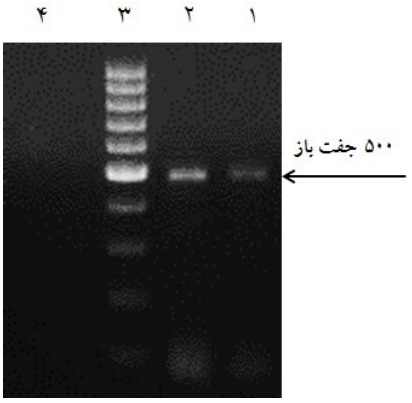
ز) تجزیه و تحلیل آماری: نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه با مقایسات زوجی حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ با سه تکرار و به کمک نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Microsoft Office Excel نسخه ۲۰۰۷ استفاده شد.

یافته‌ها

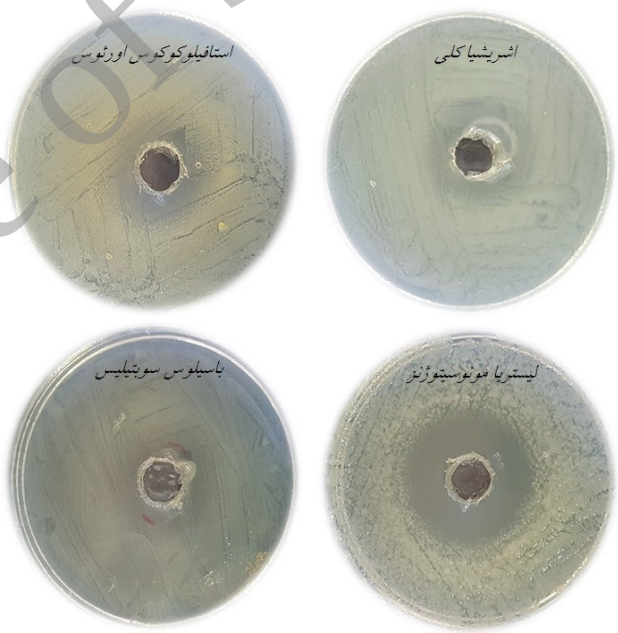
پس از چهار روز تکرار فرایند مایه‌گیری با ثبات نسبی اسیدیته قابل تیتر خمیرترش، جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو به روشی که توضیح داده شد جداسازی گردید. این جدایه یک کوکسی گرم مثبت، کاتالاز منفی با رشد بهینه در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس بود. ارزیابی اولیه تکثیر توالی هدف DNA تک پرگنه خالص این جدایه با الکتروفورز محصولات تولیدی نیز نشان داد که این جدایه به خانواده باکتری‌های اسید لاکتیک (با توجه به سطح اختصاصیت پرایمر مورد استفاده) تعلق دارد (شکل ۱). نتایج توالی‌یابی محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی از DNA تک پرگنه این جدایه نیز پس از مقایسه

Archive of SID

www.SID.ir



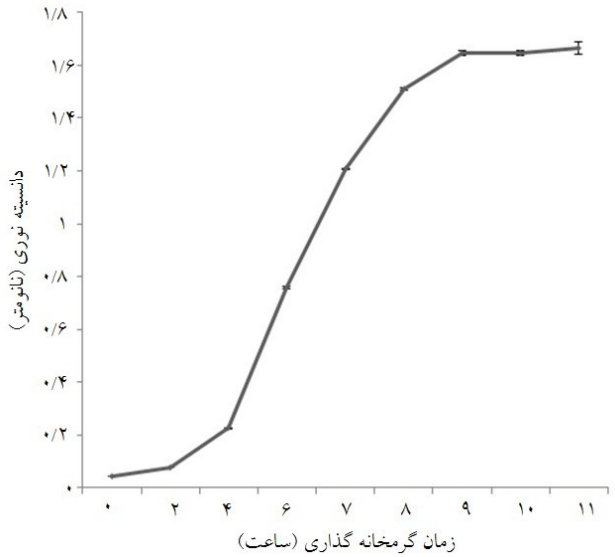
شکل ۱: نتایج الکتروفورز محصولات تکثیر شده با روش PCR. ستون ۱) قطعه ۵۰۰ جفت بازی تکثیر شده با استفاده از پرایمر اختصاصی برای شناسایی جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو، ستون ۲) کنترل مثبت حاوی DNA حاصل از کشت خالص *Lactobacillus* sp. (PTCC ۱۳۳۲)، ستون ۳) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ٤) کنترل منفی.



شکل ۲: مقایسه قطر هاله عدم رشد شاخص های باکتریایی تحت تاثیر *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* با روش انتشار چاهک.

توالی یاد شده با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) با استفاده از رویه BLASTn منجر به شناسایی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* (*Pediococcus pentosaceus*) گردید.

در ادامه، اثر آنتاگونیستی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بر روی شاخص‌های باکتریایی مورد مطالعه با تعیین قطر هاله عدم رشد



نمودار ۱: منحنی رشد جدایه *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* به منظور تعیین فازهای رشد لگاریتمی و سکون آن.

آنها تحت تاثیر جدایه *مذکور* مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۲). ارزیابی آماری نتایج نشان داد که قطر هاله عدم رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در مجاورت *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* به شکل معنی‌داری از سه شاخص باکتریایی دیگر بیشتر است. همچنین اثر آنتاگونیستی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* نسبت به *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* کمتر می باشد. پس از رسم منحنی رشد جدایه لاکتیکی نیز مشخص گردید که *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* پس از گذشت ۹ ساعت از تلقیح اولیه (کدورت ۰/۲ در جذب نوری ٦۰۰ نانومتر) در دمای بهینه رشد به انتهای فاز رشد لگاریتمی می رسد (نمودار ۱).

بنابراین نمونه‌برداری در فواصل زمانی ۸ و ۱۲ ساعت به ترتیب برای تهیه پالیده کشت از انتهای فاز رشد لگاریتمی و اوایل فاز سکون جدایه یاد شده صورت گرفت. در ادامه، فعالیت باکتریوسینی پالیده‌های مذکور نیز بر روی شاخص‌های باکتریایی مورد مطالعه تعیین گردید (جدول ۱).

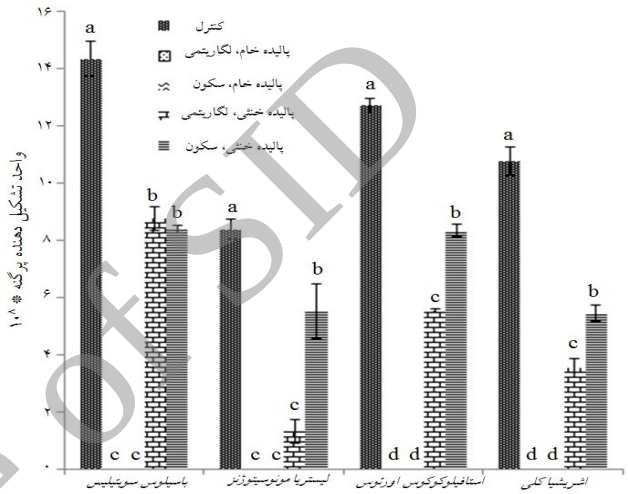
بر این اساس، فعالیت باکتریوسینی پالیده خام فاز رشد لگاریتمی بر روی هر چهار شاخص باکتریایی مورد مطالعه از مقدار بیشتری در مقایسه با سه پالیده دیگر برخوردار بود. همچنین بین مقادیر فعالیت باکتریوسینی پالیده‌های خام فازهای

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: فعالیت باکتریوسینی پالیده های کشت *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بر حسب AU/ml (میانگین± انحراف معیار).

	اشریشیا کلی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*لیستریا مونوسیتوژنز*	*باسیلوس سوبتیلیس*
پالیده خام، لگاریتمی	۸۱۷/۵۳±۰/۳۶ a	۷۹۷/۸۲±۰/۳۵ a	۹۳۵/۶۷±۰/۲۸ a	۷۸۹/۶۰±۰/۹۱ a
پالیده خام، سکون	۸۰۸/٤٦±۰/٦١ a	۷۹٤/۷۸±۰/۵۳ a	۹۳۸/۲۰±۰/۷٤ a	۷۳۲/۰۷±۰/۵۹ a
پالیده خنثی، لگاریتمی	۷٤۲/۰۹±۰/۲۳ b	۷۳٦/۵۱±۰/٤٤ b	۸٤۷/٤۲±۰/۱۹ b	۷۲۱/۷۵±۰/۸۰ b
پالیده خنثی، سکون	۷۳۸/۵۵±۰/٤۷ b	۷۳۲/٤۱±۰/٦۹ b	۸٤۵/۳۹±۰/۱۳ b	۷۲۰/۲۱±۰/۷۸ b

* حروف مشابه در هر ستون، نشانگر عدم تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ می باشد.



نمودار ۲: مقایسه تاثیر بازدارندگی پالیده های خام و خنثی حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بر روی جمعیت شاخص های باکتریایی به روش میکرودایلوشن. حروف مشابه در مورد هر شاخص باکتریایی، نشانگر عدم تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ می باشد.

رشد لگاریتمی و سکون در مورد هر چهار شاخص باکتریایی، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اما مقادیر فعالیت باکتریوسینی پالیده‌های خام و خنثی در مورد هر یک از فازهای رشد لگاریمی و سکون به شکل معنی‌داری با یکدیگر تفاوت داشتند. مقایسه تاثیر بازدارندگی پالیده‌های خام و خنثی حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بر روی جمعیت شاخص‌های باکتریایی مورد مطالعه به روش میکرودایلوشن نیز در نمودار ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌گردد، پالیده‌های کشت جدایه لاکتیکی در مقایسه با نمونه کنترل، تاثیر معنی‌داری بر کاهش جمعیت هر یک از شاخص‌های باکتریایی داشت. به طوری که پالیده خام حاصل از هر دو فاز رشد لگاریتمی و سکون به طور کامل از رشد هر چهار شاخص باکتریایی ممانعت نمود (بازدارندگی ۱۰۰ درصد).

بحث

به دلیل تفاوت اکوسیستم خمیرترش‌های متفاوت، امکان مواجهه با فلور میکروبی منحصر به فرد در هر یک از انواع خمیرترش نامحتمل نیست. خمیرترش حاصل از آرد جو نیز یکی از اکوسیستم‌های غذایی محسوب می‌شود که علیرغم قدمت دیرینه، فلور میکروبی آن کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. لذا جداسازی، شناسایی دقیق و همچنین ارزیابی ویژگی های بالقوه این آغازگرها نخستین مرحله برای معرفی آنها به منظور استفاده صنعتی محسوب می‌شود.

مسلماً تعیین خصوصیات کاربردی مانند قابلیت‌های ضد میکروبی کشت‌های آغازگر انتخابی جدا شده از چنین اکوسیستم‌هایی می‌تواند اطمینان از تخمیر کنترل شده و کیفیت استاندارد فراورده‌های تولیدی با آنها را تضمین نماید (۱۵ و ۲۳). امروزه با توجه به محدودیت‌ها و نگرانی‌های استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی در صنعت فرآوری مواد غذایی، جایگزینی آنها با نگهدارنده‌های زیستی از اهمیت فراوانی برخوردار شده است.

از سوی دیگر، خاصیت ضد میکروبی نیز یکی از مهم‌ترین ویژگی‌ها برای آغازگرهای لاکتیکی به شمار می‌آید. باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از خمیرترش نیز نامزدهای بسیار مناسبی برای استفاده به عنوان نگهدارنده‌های زیستی هستند چرا که لازمه تطابق آنها با شرایط تخمیر غیر اسپیک این اکوسیستم، برخورداری از قابلیت ضد میکروبی بالا برای رقابت با

Archive of SID
www.SID.ir

میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و ناخواسته موجود در تخمیر غیر اسپیک خمیرترش در مقایسه با تخمیرهای کنترل شده و اسپتیک می‌باشد. مسلما باکتری‌های اسید لاکتیک غالب موجود در خمیرترش نیز به واسطه غلبه بر فلور میکروبی موجود در شرایط مذکور از توانایی بیشتری در این خصوص برخوردارند (۳ و ٤).

تا کنون خواص ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* جدا شده از یک نمونه خمیرترش ایرانی در برابر سه باکتری بیماری‌زای *سودوموناس آئروژینوسا* (*Pseudomonas aeruginosa*)، *کلبسیلا نمونیه* (*Klebsiella pneumoniae*) و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلن گزارش گردیده است (۱۳). همچنین در پژوهش دیگری تاثیر بازدارندگی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از یک نمونه خمیرترش سنّتی ایران بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس لیکنی فورمیس* (*Bacillus licheniformis*) مورد تایید قرار گرفته و عامل اصلی موثر در خاصیت ضد میکروبی این جدایه‌ها نیز عمدتا تولید اسیدهای آلی و یا ترکیبات شبه باکتریوسینی توسط آنها عنوان شده است (۲٤).

در این پژوهش پس از شناسایی مولکولی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* به عنوان جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو، اثر آنتاگونیستی جدایه مذکور بر روی برخی از شاخص‌های باکتریایی غذازاد محرز گردید. از بین شاخص‌های باکتریایی مورد مطالعه، این اثر بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و خصوصا *باسیلوس سوبتیلیس* بیشتر بود.

تودورو (Todorov) و دیکس (Dicks) در سال ۲۰۰۵ اثر ضد لیستریایی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جدا شده از بوزا (Boza) به عنوان یک نوشیدنی تخمیری مبتنی بر غلات را به پدیوسین تولیدی توسط آن نسبت دادند (۲۰). علاوه بر این، وجود یک جایگاه حفاظت شده در توالی DNA ریبوزومی باکتری‌های اسید لاکتیک مولّد ترکیبات شبه باکتریوسینی بر علیه لیستریا به اثبات رسیده است (۲۰ و ۲۵) که می‌تواند توضیحی برای تفاوت نتایج آزمون خاصیت آنتاگونیستی جدایه لاکتیکی به روش انتشار چاهک در برابر شاخص‌های باکتریایی مورد مطالعه در این پژوهش و تاثیر بیشتر آن بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* باشد.

ارزیابی تاثیر بازدارندگی پالیده‌های حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بر روی شاخص‌های باکتریایی مورد مطالعه در این پژوهش نیز حاکی از اثر مشهود ضد باکتریایی آنها بود. تفاوت تاثیر خنثی نمودن pH بر فعالیت باکتریوسینی پالیده‌های خام و خنثی (جدول ۱)، نشان دهنده فعالیت بیشتر این ترکیبات در pH اسیدی بود که با نتایج تودورو و دیکس (۲۰) و همچنین احمدوا (Ahmadova) و همکاران (۲۱) مطابقت دارد.

بر اساس گزارش این محققین از آنجایی که ترکیبات شبه باکتریوسینی عموما در شکل غیر یونیزه شده خود قابلیت نفوذ بیشتری به پیکره میکروارگانیسم‌ها دارند و همچنین با توجه به اینکه ترکیبات مذکور در pH حدود ٤ نسبت به pH خنثی، به شکل غیر یونیزه شده هستند. بنابراین تاثیر ضد میکروبی آنها با خنثی نمودن اسید، کاهش می‌یابد.

در بخش دیگری از این پژوهش نیز مشخص شد که پالیده خام جدایه لاکتیکی نسبت به پالیده خنثی شده آن از قابلیت ضد باکتریایی بیشتری برخوردار است که علاوه بر توضیح ذکر شده در خصوص تفاوت فعالیت باکتریوسینی مربوط به این پالیده‌ها، دلایل دیگر تفاوت اثر ضد باکتریایی پالیده‌های خام و خنثی می‌تواند ناشی از اثر ضد میکروبی اسیدهای آلی و یا تاثیر تقویت کننده شرایط اسیدی بر برخی از ترکیبات ضد باکتریایی تولید شده باشد. به طوری که با حذف اسیدهای آلی در پالیده خنثی این اثرات نیز کاهش یافته و یا حذف می‌گردد. اثر بازدارنده قوی‌تر ناشی از پالیده‌های فاز لگاریتمی در این پژوهش را نیز می‌توان به تولید ترکیبات باکتریوسینی و شبه باکتریوسینی موثرتر در این فاز (متابولیت‌های اولیه) نسبت داد. همچنین وجود خاصیت ضد باکتریایی در پالیده‌های خنثی شده این جدایه نشان می‌دهد که *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* به جز اسیدهای آلی قادر به تولید ترکیبات بازدارنده در هر دو فاز رشد لگاریتمی و سکون است (۲٦ و ۲۷).

Archive of SID

www.SID.ir

جدایه های لاکتیکی، ترکیبات ضد میکروبی متنوعی مانند اسیدهای آلی، دی استیل، استون، پراکسید هیدروژن، روتروسایکلین، پپتیدهای ضد قارچی و باکتریوسین تولید می‌کنند. اگر چه حداکثر میزان تولید ترکیبات ضد میکروبی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک ممکن است در فازهای مختلف چرخه رشد آنها صورت گیرد، اما بررسی‌ها نشان داده است که فاز رشد لگاریتمی برای تولید اکثر این ترکیبات مطلوب‌تر است. باکتریوسین‌ها نیز جزء متابولیت‌های اولیه هستند که در فاز رشد لگاریتمی تولید می‌شوند. هر چند بر اساس نتایج برخی گزارشات، تولید باکتریوسین‌ها ممکن است در اوایل فاز سکون نیز تداوم یابد. بنابراین عموما انتظار می‌رود خاصیت ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک در فاز رشد لگاریتمی آنها مشهودتر باشد.

پدیوسین‌ها نیز یکی از انواع باکتریوسین‌های خانواده غیر لانتی‌بیوتیک هستند که به دلیل فعالیت ضد لیستریایی خود معروف می‌باشند. این باکتریوسین‌ها حاوی هیچ نوع اسید آمینه اصلاح شده‌ای نبوده و انتهای کربوکسیل آنها، مسئول فعالیت ویژه این ترکیبات است که منجر به نفوذپذیری دیواره سلول هدف می‌گردد.

انتخاب آغازگرهای لاکتیکی با توانایی ضد میکروبی، نقش تخمیر را در جلوگیری از فسادهای میکروبی تقویت می‌کند و ترکیب اسیدهای آلی با سایر متابولیت‌های ضد میکروبی در این مورد، اهمیت دارد. باکتری‌های اسید لاکتیک با ایجاد شرایط اسیدی، محیط را برای رشد باکتری‌های مولّد فساد، نامساعد نموده، ضریب تخریب حرارتی آنها و تاثیر ترکیبات ضد باکتریایی را افزایش داده و لذا زمان ماندگاری فراورده تولیدی را بهبود می‌دهند (۲۶ و ۲۸).

نتیجه‌گیری

امروزه با توجه به محدودیت‌ها و نگرانی‌های استفاده از نگهدارنده‌های سنتزی در صنعت فرآوری مواد غذایی، جایگزینی آنها با نگهدارنده‌های زیستی از اهمیت فراوانی برخوردار شده است. خاصیت ضد میکروبی نیز یکی از مهم‌ترین ویژگی‌ها برای آغازگرهای لاکتیکی به شمار می‌آید. بر اساس نتایج این پژوهش، *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جدا شده از خمیرترش آرد کامل جو و پالیده‌های کشت آن دارای خاصیت ضد باکتریایی مشهودی بودند. تاثیر آنتاگونیستی جدایه یاد شده بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* در مقایسه با سایر شاخص‌های باکتریایی مورد مطالعه بیشتر بود. همچنین پالیده‌های کشت این جدایه در مقایسه با نمونه کنترل، تاثیر معنی‌داری بر کاهش جمعیت هر یک از شاخص‌های باکتریایی مورد مطالعه داشت. به طوری که حتی پالیده خام حاصل از هر دو فاز رشد لگاریتمی و سکون به طور کامل از رشد آنها ممانعت نمود. بر اساس این نتایج می‌توان از جدایه *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* به عنوان کشت آغازگر و یا کشت همراه در فرآوری محصولات غذایی تخمیری به جای نگهدارنده‌های شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی با هدف بهبود ماندگاری و ارتقاء سلامت این فراورده‌ها استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و همچنین معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گلستان که هزینه‌های اجرایی این پژوهش را در قالب یک طرح مشترک بین دانشگاهی تامین نمودند، کمال امتنان را دارند.

References

1. Hammes WP, Brandt MJ, Francis KL, Rosenheim J, Seitter MFH, Vogelmann SA. Microbial ecology of cereal fermentations. Trends Food Sci Tech. 2005; 16(1-3): 4-11.
2. Corsetti A, Settanni L. Lactobacilli in sourdough fermentation. Food Res Int. 2007; 40(5): 539-558.
3. Messens W, De Vuyst L. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from

Archive of SID
www.SID.ir

sourdoughs, a review. Int J Food Microbiol. 2002; 72(1): 31-43.
4. Simsek O, Hilmi Con A, Tulumoglu S. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. Food Control. 2006; 17(4): 263-270.
5. Katina K, Arendt E, Liukkonen KH, Autio K, Flander L, Poutanen K. Potential of sourdough for healthier cereal products. Trends Food Sci Tech. 2005; 16(1-3): 104-112.
6. Poutanen K, Flander L, Katina K. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. Food Microbiol. 2009; 26(7): 693-699.
7. Todorov S, Onno B, Sorokine O, Chobert JM, Ivanova I, Dousset X. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST31 isolated from sourdough. Int J Food Microbiol. 1999; 48(3): 167-177.
8. Katina K, Sauri M, Alakomi HL, Mattila-Sandholm T. Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. Food Sci Tech. 2002; 35(1): 38-45.
9. Pepe O, Blaiotta G, Moschetti G, Greco T, Villani F. Rope producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. Appl Environ Microb. 2003; 69(4): 2321-2329.
10. Leroy F, De Winter T, Adriany T, Neysens P, De Vuyst L. Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. Int J Food Microbiol. 2006; 112(2): 102-111.
11. Mentes O, Ercan R, Akcelik M. Inhibitor activities of two *Lactobacillus* strains, isolated from sourdough, against rope-forming *Bacillus* strains. Food Control. 2007; 18(4): 359-363.
12. Corsetti A, Settanni L, Braga TM, Silva Lopes MF, Suzzi G. An investigation of the bacteriocinogenic potential of lactic acid bacteria associated with wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. Food Sci Tech. 2008; 41(7): 1173-1182.
13. Alizadeh S, Jamalifar H, Samadi N, Eaidi A, Fazeli M. Effect of sodium chloride on the kinetics of growth and antimicrobial potential of lactobacilli isolated from Iranian traditional sourdough. Iran J Nutr Sci Food Tech. 2010; 5(3): 47-56. [In Persian]
14. Zannini E, Garofalo C, Aquilanti L, Santarelli S, Silvestri G, Clementi F. Microbiological and technological characterization of sourdoughs destined for bread-making with barley flour. Food Microbiol. 2009; 26(7): 744-753.
15. Mariotti M, Garofalo C, Aquilanti L, Osimani A, Fongaro L, Tavoletti S, Hager AS, Clementi F. Barley flour exploitation in sourdough bread-making: a technological, nutritional and sensory evaluation. Food Sci Tech. 2014; 59(2): 973-980.
16. AACC International. Approved methods of the American association of cereal chemists. 11th Ed. The St. Paul. 2010.
17. Ferchichi M, Valcheva R, Vost H, Onno B, Dousset X. Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. Food Microbiol. 2007; 24(7-8): 678-686.
18. Gulahmadov SG, Abdullaeva NF, Guseinova NF, Kuliev AA, Ivanova IV, Dalgalarondo M, Chobert JM, Haertlee T. Isolation and characterization of bacteriocin-like inhibitory substances from lactic acid bacteria isolated from Azerbaijan cheeses. Appl Biochem Microbiol. 2009; 45 (3): 266-271.
19. Yang E, Fan L, Jiang Y, Doucette C, Fillmore S. Antimicrobial activity of bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. AMB Express. 2012; 2(1): 48-59.

Archive of SID
www.SID.ir

20. Todorov SD, Dicks LMT. Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. Process Biochem. 2005; 40(1): 365-370.

21. Ahmadova A, Todorov SD, Hadji-Sfaxi I, Choiset Y, Rabesona H, Messaoudi S, Kuliyev A, de Melo Franco BDG, Chobert JM, Haertlé T. Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. Anaerobe. 2013; 20: 42-49.

22. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Med Microbiol. 2009; 49(11): 1749-1755.

23. Chavan RS, Chavan SR. Sourdough technology, a traditional way for wholesome foods: a review. Comp Rev Food Sci Food Saf. 2011; 10(3): 170-183.

24. Sadeghi A, Mortazavi SA, Bahrami AR, Shahidi F, Matin MM, Khomeiri M. Evaluating the effect of plasmid on anti-ropiness activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from Iranian traditional sourdough. Iran J Nutr Sci Food Tech. 2011; 6: 22 [In Persian].

25. Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. Food Control. 2006; 17(6): 454-461.

26. Gálvez A, Abriouel H, López RL, Ben Omar N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. Int J Food Microbiol. 2007; 120(1-2): 51-70.

27. Corsetti A, Settanni L, Van Sinderen D. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their in vitro and in situ activity. J Appl Microbiol. 2004; 96(3): 521-534.

28. Reis JA, Paula AT, Casarotti SN, Penna ALB. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. Food Eng Rev. 2012; 4(2): 124-140.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 4, January 2017

Original Article

Molecular characterization and evaluation of the antibacterial properties of *Pediococcus pentosaceus* isolated from whole barley sourdough

Alireza Sadeghi[1], Mojtaba Raeisi[2], Maryam Ebrahimi[3], Balal Sadeghi[4]

[1]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. [2]Assistant Professor, Cereal Health Research Center, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran. [3]Ph.D. student, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. [4]Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Usually identification and characterization of ecosystems isolates of lactic acid bacteria (LAB) which have been rarely studied lead to obtaining LAB with unique characteristics. The aims of this study were molecular characterization and evaluation of the antibacterial properties of dominant LAB isolated from whole barley sourdough.

Materials & Methods: In this experimental study, first the sourdough was prepared from the whole barley flour, and subsequently its dominant LAB was isolated. LAB isolate was identified by sequencing of PCR products. Antibacterial properties of the isolate and its cell free culture filtrate (CCF) which was obtained from logarithmic and stationary phases as crud and naturalized form were also investigated for some food-borne indicator bacteria using well diffusion and microdilution methods, respectively.

Results: Sequencing results of PCR products lead to identification of *Pediococcus pentosaceus* as the dominant LAB in whole barley sourdough. This LAB isolate had more antagonistic effect ($p<0.05$) on *Listeria monocytogenes* than other indicator bacteria. Furthermore, crud CCF obtained from logarithmic phase of the isolate had the highest bacteriocin activity and antibacterial ability in comparison to other CCFs.

Conclusion: Whole barley sourdough *P. pentosaceus* isolate and its CCF have proper antibacterial properties against food-borne indicator bacteria used in this study. Therefore, *P. pentosaceus* has high potential to be used as microbial starter or adjunct culture in processing fermented foods instead of chemical preservatives or antibiotics in order to increase shelf life and safety of these products.

Keywords: Barley sourdough, *Pediococcus pentosaceus*, Antibacterial properties, Cell free culture filtrate.

Correspondence to: Alireza Sadeghi

Tel: +98 9155080383

E-mail: sadeghi.gau@gmail.com

Journal of Microbial World 2017, 9(4): 326-336.

Archive of SID

www.SID.ir