Archive of SID

ارزیابی تأثیر pH، دما و نمک بر فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های لاکتیکی خمیرترش آرد جو بر علیه *باسیلوس سوبتیلیس* و بررسی تغییرات فراسنجه‌های خونی و آنزیم‌های کبدی موش تغذیه شده با جدایه‌های لاکتیکی

مریم ابراهیمی[۱]، مریم خشایی[۲]، فرزانه کیادلیری[۲]، علیرضا صادقی[۳*]

۱. استادیار مرکز تحقیقات سلامت غلات، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زیست‌فناوری مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۳. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: sadeghi.gau@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۷/۱۲/۱٤ پذیرش نهایی: ۹۸/٤/۱۹)

چکیده

در این مطالعه تجربی، تأثیر تیمارهای مختلف pH (۲، ٤ و ۱۱)، دما (٤، ۸۵ و ۱۲۱ درجه سلسیوس) و نمک صفراوی (۰/۳، ۰/٦ و ۱ درصد) بر قدرت مهارکنندگی پالیده (روماند فاقد سلول) کشت باکتری‌های اسید لاکتیک غالب جدا شده از خمیرترش آرد کامل جو (*پدیوکوکوس استیلسی*، *ویسلا سیباریا*، *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس کوریا*) بر علیه *باسیلوس سوبتیلیس* در مقایسه با پالیده تیمار نشده آن‌ها به روش میکرودایلوشن مورد بررسی قرار گرفت. ایمنی مصرف این جدایه‌های لاکتیکی نیز با بررسی تغییرات فراسنجه‌های خونی و آنزیم‌های کبدی موش تغذیه شده با آن‌ها بررسی گردید. تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از این آزمون‌ها نیز با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که پالیده کشت باکتری‌های اسید لاکتیک مورد مطالعه بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* دارای فعالیت آنتاگونیستی بودند. هم‌چنین اثر بازدارنده پالیده کشت باکتری‌های مذکور، تحت تأثیر تیمارهای pH و دما، کاهش و تحت تأثیر تیمارهای نمک مورد مطالعه، افزایش یافت. تغییرات فراسنجه‌های خونی و آنزیم‌های کبدی موش تغذیه شده با جدایه‌های لاکتیکی نیز در محدوده نرمال قرار داشت و لذا ایمنی مصرف این باکتری‌های اسید لاکتیک تایید گردید. با توجه به فعالیت آنتاگونیستی پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی مورد مطالعه تحت تیمارهای pH، دما و نمک بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* می‌توان از این پالیده‌ها به‌عنوان یک نگهدارنده زیستی در زنجیره فرآوری مواد غذایی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: جدایه لاکتیکی، نگهدارنده زیستی، خمیرترش

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

عموماً برای کاهش تعداد میکروارگانیسم‌های ناخواسته و یا جلوگیری از رشد آن‌ها در حین فرآوری، توزیع و انبارمانی محصولات غذایی از آنتی‌بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های شیمیایی استفاده می‌شود. البته به واسطه اثرات نامطلوب چنین ترکیباتی بر سلامت مصرف کننده، تلاش‌های فراوانی برای جایگزینی آن‌ها با نگهدارنده-های زیستی نظیر باکتری‌های اسید لاکتیک و یا پالیده کشت آن‌ها نیز صورت گرفته است (Havelaar *et al.*, 2010).

باکتری‌های اسید لاکتیک، گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، فاقد اسپور و کاتالاز منفی هستند که محصول نهایی تخمیر کربوهیدرات‌ها توسط آن‌ها اسید لاکتیک می‌باشد. این باکتری‌ها به نحو گسترده‌ای به‌عنوان کشت آغازگر و کشت همراه در صنایع تخمیری مورد استفاده قرار می‌گیرند (Leroy and De Vuyst, 2004). فعالیت ضدمیکروبی این باکتری‌ها نیز به تولید ترکیباتی مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دی استیل، اتانول، دی‌اکسید کربن، باکتریوسین‌ها، ترکیبات شبه باکتریوسینی، اسیدهای چرب و استر آن‌ها نسبت داده می‌شود (Messens and De Vuyest, 2002). این باکتری‌ها نه تنها سبب کاهش میکروارگانیسم‌های ناخواسته می‌شوند بلکه می‌توانند متابولیت‌های مضر و برخی از سموم احتمالی تولید شده توسط آن‌ها را نیز بی‌اثر نمایند (Vanderbergh, 1993). امروزه استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های ضدمیکروبی آن‌ها در پیشگیری از فساد فراورده‌های غذایی و افزایش زمان ماندگاری آن‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. پژوهش‌های انجام شده نیز مویّد نقش مثبت این باکتری‌ها و پالیده کشت آن‌ها در مهار عوامل بیماری‌زا و مولّد فساد مواد غذایی می‌باشد (Suskovic *et al.*, 2010).

یکی از جالب‌توجه‌ترین خصوصیات باکتری‌های اسید لاکتیک، فعالیت آنتاگونیستی این باکتری‌ها و پالیده کشت آن‌ها برعلیه باکتری‌های اسپورساز بیماری‌زا و مولّد فساد نظیر *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) است که دارای مقاومت دمایی بالا و پایداری منحصر به فردی در برابر سایر فرایندهای مرسوم سالم‌سازی فراورده‌های غذایی هستند (Katina *et al.*, 2002). در پژوهشی اثر ممانعت‌کننده ترکیبات شبه باکتریوسینی تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* بررسی گردیده و فعالیت بازدارنده مناسب این ترکیبات مشخص شده است (Corsetti *et al.*, 1996). هم‌چنین اثر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) و پالیده کشت این باکتری در جلوگیری از رشد *باسیلوس سوبتیلیس* عامل فساد روپینس (طنابی شدن نان) گزارش گردیده است. روپینس بعد از کپک‌زدگی، مهم‌ترین فساد میکروبی نان بوده و معمولاً توسط گونه‌های *باسیلوس* خصوصاً *باسیلوس سوبتیلیس* ایجاد می‌شود (Valerio *et al.*, 2008). اثر ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک و پالیده کشت آن‌ها بر روی باکتری‌های بیماری‌زای جدا شده از مواد غذایی و کنترل آن‌ها در نان گندم مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده است که بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک قادر به جلوگیری از رشد *باسیلوس*ها هستند (Cizeikiene *et al.*, 2013). علاوه بر

www.SID.ir

Archive of SID

این، قابلیت خمیرترش (تخمیر غیراسپتیک مخلوط آب و آرد) نیز در ممانعت از روپینس نان مورد تأیید قرار گرفته لذا احتمالاً باکتری‌های غالب جدا شده از اکوسیستم تخمیری خمیرترش نیز به واسطه تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی، دارای خاصیت بازدارندگی جالب توجهی بر روی باسیلوس‌های مولّد روپینس باشند (Katina, 2005).

هدف از این پژوهش، تعیین تأثیر تیمارهای مختلف pH، دما و نمک صفراوی (که به شکل طبیعی در دستگاه گوارش و یا در حین فرآوری و نگهداری مواد غذایی بر آن‌ها اعمال می‌شوند)، بر فعالیت آنتاگونیستی پالیده کشت باکتری‌های اسید لاکتیک غالب جدا شده از خمیرترش آرد کامل جو برعلیه *باسیلوس سوبتیلیس* و هم‌چنین بررسی تغییرات فراسنجه‌های خونی و آنزیم‌های کبدی موش تغذیه شده با این جدایه‌های لاکتیکی به‌منظور ارزیابی ایمنی مصرف آن‌ها بود.

مواد و روش‌ها

- باکتری‌های اسید لاکتیک

باکتری‌های اسید لاکتیک مورد استفاده در این پژوهش شامل *پدیوکوکوس استیلسی* (*Pediococcus stilesii*)، *ویسلا سیباریا* (*Weissella cibaria*)، *لاکتوباسیلوس برویس* (*Lactobacillus brevis*) و *لاکتوباسیلوس کوریا* (*Lactobacillus curieae*) از بین جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو که با توالی‌یابی محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی، تأیید شناسایی شده و خصوصیات ضدمیکروبی آن‌ها نیز محرز گردیده بود، تأمین شدند (Sadeghi *et al.*, 2017).

- تهیه پالیده یا روماند فاقد سلول (Cell free supernatant) کشت جدایه‌های لاکتیکی

در ابتدا باکتری‌های اسید لاکتیک در محیط کشت MRS broth (Merck, Germany) در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند تا کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند (۱×۱۰^{۸} CFU/mL) به‌دست آمد. سپس برای تهیه پالیده کشت باکتری‌های اسید لاکتیک، محیط کشت حاوی این باکتری‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۵ درجه سلسیوس با ۱٤۰۰۰g، سانتریفوژ (Hanil, Combi 514R, South Korea) گردید. مایع رویی به‌دست آمده از سانتریفوژ برای اطمینان از عدم حضور سلول و لاشه باکتریایی از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرونی (Jet Biofil, China) عبور داده شد. در ادامه، برای خنثی‌سازی اثر اسیدهای آلی، پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی با سود ۱ نرمال (Merck, Germany) استریل تا رسیدن به pH=۷ خنثی گردید (Lavermicocca *et al.*, 2003).

- آماده‌سازی باکتری شاخص

کشت لیوفیلیزه *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis* PTCC 1720) از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. این شاخص باکتریایی در محیط کشت Nutrient broth (Merck, Germany) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شد و سپس جمعیت آن به ۱×۱۰^{۸} CFU/mL تنظیم گردید (Lavermicocca *et al.*, 2003).

www.SID.ir

Archive of SID

- ارزیابی خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی

برای ارزیابی خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت باکتری‌های اسید لاکتیک مورد مطالعه از روش میکرودایلوشن استفاده شد. در هر چاهک میکروپلیت (Jet Biofil, China)، حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر شامل ۱۸۵ میکرولیتر از پالیده کشت هر جدایه لاکتیکی و ۱۵ میکرولیتر از شاخص باکتریایی اضافه گردید. نمونه کنترل منفی، حاوی ۱۸۵ میکرولیتر پالیده و ۱۵ میکرولیتر شاخص باکتریایی اتوکلاو شده و نمونه کنترل مثبت نیز حاوی ۱۸۵ میکرولیتر محیط کشت MRS broth و ۱۵ میکرولیتر شاخص باکتریایی بودند. در نهایت میکروپلیت به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد و سپس جذب‌سنجی توسط اسپکتروفتومتر (PG Instruments LTD T80, England) در طول موج ٦٢٠ نانومتر صورت گرفت (Lavermicocca *et al*., 2003).

- ارزیابی تأثیر تیمارهای pH، دما و نمک صفراوی بر خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی

جهت بررسی اثر pH بر خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت باکتری‌های اسید لاکتیک، ابتدا pH پالیده‌ها با استفاده از اسید کلریدریک (Merck, Germany) و سود ۱ نرمال استریل در مقادیر ۲، ٤ و ۱۱ (به‌ترتیب pH معده، خمیرترش و روده) تنظیم گردید. سپس به‌ترتیب به‌مدت ٤، ٢٤ و٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس (به‌ترتیب زمان‌های مربوط به تیمارهای pH اعمال شده برای معده، خمیرترش و روده) گرمخانه‌گذاری و در نهایت pH آن‌ها خنثی و به‌منظور حذف نمک‌های تولیدی مجدداً از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد. به‌منظور ارزیابی مقاومت ترکیبات بازدارنده پالیده‌ها به کاهش و افزایش دما نیز پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی در دماهای ٤ درجه سلسیوس (دمای یخچال)، ۸۵ درجه سلسیوس (دمای پاستوریزاسیون) و ۱۲۱ درجه سلسیوس (دمای استریلیزاسیون) به‌ترتیب به‌مدت ۳٦۰، ۳۰ و ۱۵ دقیقه قرار گرفت و پس از رسیدن به دمای محیط مجدداً فیلتر گردید. جهت بررسی مقاومت ترکیبات ضدمیکروبی موجود در پالیده کشت باکتری‌های اسید لاکتیک در برابر نمک صفراوی نیز پالیده‌ها به‌مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تحت تیمارهای ۰/۳، ۰/٦ و ۱ درصد نمک صفراوی (Sigma-Aldrich, USA) قرار گرفتند. سپس پالیده‌های تیمار شده از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شدند. خاصیت آنتاگونیستی تمامی پالیده‌های تیمار شده بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* نیز همان‌طور که قبلاً توضیح داده شد به‌روش میکرودایلوشن در مقایسه با پالیده تیمار نشده (نمونه شاهد) مورد بررسی قرار گرفت (Assefa *et al*., 2008).

- بررسی تغییرات فراسنجه‌های خونی و آنزیم‌های کبدی موش تغذیه شده با جدایه‌های لاکتیکی

تعداد ٤۰ عدد موش ماده از نژاد سوری با سن تقریبی ٤ تا ۵ هفته از انستیتو پاستور آمل، خریداری و در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی- ۱۲ ساعت تاریکی، غذای استاندارد، دمای ۳ ± ۲۲ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ٦۰ درصد) در قفس‌های جداگانه در ۵ گروه ۸ تایی تقسیم و نگهداری شدند. تمام موش‌ها پس از انتقال به حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی گلستان، به‌منظور تطبیق با محیط جدید به‌مدت یک هفته در شرایط استاندارد، نگهداری و سپس مطالعه

www.SID.ir

Archive of SID

روی آن‌ها مطابق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (OECD/OCDE) صورت گرفت. طی ۲۸ روز، هر روز ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات حاوی 10^8 کلنی از *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس کوریا*، *پدیوکوکوس استیلسی* و *ویسلا سیباریا* با کمک سوزن استریل مخصوص گاواژ به‌ترتیب به موش‌های گروه اول تا چهارم خورانده شد در حالی‌که گروه کنترل تنها ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات فاقد باکتری را دریافت کرد. در پایان ۲۸ روز تغذیه دهانی، خون گیری از قلب موش‌ها انجام گرفت و نمونه‌های خون به یک آزمایشگاه تشخیص طبی معتبر جهت بررسی فاکتورهای خونی شامل شمارش گلبول‌های سفید (WBC)، شمارش گلبول‌های قرمز (RBC)، شمارش پلاکت‌ها (PLT)، حجم متوسط گلبول‌های قرمز (MCV)، غلظت متوسط هموگلوبین (MCHC) و مقدار متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCH) و هم‌چنین بررسی آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) انتقال یافت (Tsai *et al.*, 2014).

- تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با مقایسات زوجی حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ با سه تکرار و به کمک نرم‌افزار SAS نسخه ۹,۱,۳ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Microsoft Office Excel نسخه ۲۰۰۷ استفاده شد.

یافته‌ها

ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی پالیده تیمار نشده حاصل از کشت باکتری‌های اسید لاکتیک مورد مطالعه در این پژوهش برعلیه *باسیلوس سوبتیلیس* نشان داد که پالیده کشت هر چهار جدایه لاکتیکی بر رشد این شاخص باکتریایی مؤثر بودند. از بین این پالیده‌ها نیز پالیده کشت *لاکتوباسیلوس برویس*، بیش‌ترین و پالیده کشت *ویسلا سیباریا*، کم‌ترین توانایی را در مهار رشد *باسیلوس سوبتیلیس* از خود نشان دادند. علاوه بر این، فعالیت آنتاگونیستی پالیده‌های کشت *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس کوریا* به شکل معنی‌داری ($p\leq$۰/۰۵) از پالیده‌های کشت *پدیوکوکوس استیلسی* و *ویسلا سیباریا* برعلیه *باسیلوس سوبتیلیس* بیشتر بود اما بین خاصیت بازدارندگی آن‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱).

بر اساس نتایج به‌دست آمده از تأثیر تیمارهای مختلف pH بر روی خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی مورد مطالعه نیز درصد کاهش جمعیت *باسیلوس سوبتیلیس* در حضور پالیده کشت باکتری‌های اسید لاکتیک، تحت تیمارهای مختلف pH نسبت به پالیده تیمار نشده آن‌ها کم‌تر بود. هم‌چنین بیشترین خاصیت بازدارندگی پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی تحت تیمارهای pH مربوط به تیمار pH=٤ و کم‌ترین آن مربوط به تیمار pH=۱۱ بود. آنالیز آماری نتایج به‌دست آمده (جدول ۱) نیز مشخص ساخت که بین خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت باکتری‌های مورد مطالعه، تحت تیمارهای مختلف pH با خاصیت آنتاگونیستی پالیده تیمار نشده آن‌ها تفاوت معنی‌داری

www.SID.ir

Archive of SID

وجود داشت (p≤۰/۰۵). علاوه بر این، بین خاصیت بازدارندگی این پالیده‌ها تحت تیمارهای مختلف pH با یکدیگر نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (p≤۰/۰۵). هم‌چنین در pHهای ۲ و ٤ پالیده کشت *لاکتوباسیلوس کوریا* و در pH معادل ۱۱ پالیده کشت *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس کوریا* به شکل معنی‌داری (p≤۰/۰۵) از بازدارندگی بیشتری برخوردار بودند. بر اساس نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، ترکیبات ضدمیکروبی موجود در پالیده کشت باکتری‌های اسید لاکتیک مورد مطالعه نسبت به تغییرات pH حساس بوده و با کاهش و افزایش pH خاصیت آنتاگونیستی آن‌ها نیز کاهش یافت.

جدول (۱)- تأثیر تیمارهای مختلف pH بر خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی (برحسب درصد کاهش جمعیت *باسیلوس سوبتیلیس*) در مقایسه با پالیده تیمار نشده

تیمار پالیده	درصد کاهش جمعیت *باسیلوس سوبتیلیس* تحت تأثیر جدایه‌های لاکتیکی			
pH	*پدیوکوکوس استیلسی*	*ویسلا سیباریا*	*لاکتوباسیلوس برویس*	*لاکتوباسیلوس کوریا*
۲	٤۰/٤٥۰±۱/۹۲۳^{Cc}	۳۷/۳۹۰±۰/۰۲۸^{Cd}	٦۰/۲۰٥±۰/۳۰٥^{Cb}	٦٤/۹۰٥±۰/٥۳۰^{Ca}
٤	٥۱/۷٥۰±۱/٦۱۲^{Bc}	٤۹/٤۰٥±۰/٥۸۷^{Bc}	٦۳/۰۰۰±۰/۲۲٦^{Bb}	٦٦/۷۰۰±۰/۲۲٦^{Ba}
۱۱	۲۳/٤٦۰±۲/٥۷٤^{Db}	۱۹/٥۸۰±۱/۲٥۹^{Db}	٥۱/۱٦۰±۱/۲۳۰^{Da}	٥۰/۳٦۰±۰/۰۹۹^{Da}
پالیده تیمار نشده	۷٤/۸۳۰±۱/۰۰٤^{Ab}	۷۳/۱۰۰±۰/۱۷۰^{Ab}	۸۰/۷۲٥±۰/۸٤۱^{Aa}	۸۰/٥۹٥±۰/۷۰۰^{Aa}

نتایج به‌صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار بیان شده است.

A, B, C, D (حروف بزرگ ناهمسان) در هر ستون و a, b, c, d (حروف کوچک ناهمسان) در هر ردیف، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

تأثیر تیمار دما بر خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت باکتری‌های اسید لاکتیک مورد مطالعه در جدول (۲) نشان داده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت *پدیوکوکوس استیلسی* و *ویسلا سیباریا* تحت تأثیر کاهش دما، کاهش و خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت دو جدایه لاکتیکی دیگر تحت تأثیر کاهش دما، افزایش یافت. هم‌چنین بر اساس نتایج به‌دست آمده مشاهده شد که افزایش دما سبب کاهش خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت هر چهار جدایه لاکتیکی گردید. نتایج آنالیز آماری نیز نشان داد که بین خاصیت بازدارندگی پالیده کشت باکتری‌های مورد مطالعه تحت تیمار دمایی ٤ درجه سلسیوس نسبت به خاصیت بازدارندگی پالیده تیمار نشده آن‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در حالی‌که بین خاصیت بازدارندگی پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی تحت تیمارهای دمایی ۸۵ و ۱۲۱ درجه سلسیوس با خاصیت بازدارندگی پالیده تیمار نشده آن‌ها تفاوت معنی‌داری (p≤۰/۰۵) مشاهده شد. هم‌چنین در اغلب موارد بین خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت باکتری‌های اسید لاکتیک در هر تیمار دمایی با یکدیگر نیز تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵) وجود داشت. بر اساس نتایج این پژوهش، خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت باکتری‌های اسید لاکتیک تحت تیمارهای دمایی مورد ارزیابی (کاهش یا افزایش دما)، عمدتاً کاهش یافت لذا ترکیبات

www.SID.ir

Archive of SID

ضدمیکروبی موجود در پالیده کشت جدایه‌های مورد مطالعه به کاهش و افزایش دما حساس بودند. با توجه به اختلاف درصد کاهش جمعیت *باسیلوس سوبتیلیس* تحت تأثیر پالیده تیمار نشده با درصد کاهش جمعیت شاخص باکتریایی مذکور تحت تأثیر پالیده تیمار شده در دماهای مورد مطالعه، ترکیبات ضدمیکروبی موجود در پالیده حاصل از کشت *لاکتوباسیلوس کوریا* در مقایسه با ترکیبات ضدمیکروبی موجود در پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی دیگر نسبت به دمای پایین دارای کم‌ترین حساسیت و ترکیبات ضدمیکروبی موجود در پالیده کشت *لاکتوباسیلوس برویس* دارای بیشترین حساسیت بودند. در حالی‌که ترکیبات ضدمیکروبی موجود در پالیده کشت *پدیوکوکوس استیلسی* نسبت به دمای بالا حساسیت کمتر و ترکیبات ضدمیکروبی موجود در پالیده کشت *لاکتوباسیلوس کوریا* حساسیت بیشتری از خود نشان دادند.

جدول (۲)- تأثیر تیمارهای مختلف دمایی بر خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی در مقایسه با پالیده تیمار نشده

تیمار پالیده	درصد کاهش جمعیت *باسیلوس سوبتیلیس* تحت تأثیر جدایه‌های لاکتیکی			
دما (درجه سلسیوس)	*پدیوکوکوس استیلسی*	*ویسلا سیباریا*	*لاکتوباسیلوس برویس*	*لاکتوباسیلوس کوریا*
٤	٧٣/٥٨٠±٠/٤٢٤^{Ab}	٧٢/١٧٥±٠/٠٤٩^{Bb}	٨٢/٢٥٥±١/٠٦٨^{Aa}	٨٠/٦٤٠±٠/٦٣٦^{Aa}
٨٥	٦٥/٣٥٥±٠/١٣٤^{Bb}	٦٣/٤٤٠±٠/٢٦٩^{Cb}	٧٣/٩٢٥±١/٩٧٣^{Ba}	٧٤/١٤٥±١/٤٢١^{Ba}
١٢١	٦١/٥٢٥±٠/٦٤٣^{Cbc}	٥٩/٤٩٠±٠/١٤١^{Dc}	٦٥/٢١٠±١/٣٤٤^{Ca}	٦٤/١٦٠±١/٢٧٣^{Cab}
پالیده تیمار نشده	٧٤/٨٣٠±١/٠٠٤^{Ab}	٧٣/١٠٠±٠/١٧٠^{Ab}	٨٠/٧٢٥±٠/٨٤١^{Aa}	٨٠/٥٩٥±٠/٧٠٠^{Aa}

نتایج به صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار بیان شده است.

$^{A, B, C, D}$(حروف بزرگ ناهمسان) در هر ستون و a, b, c, d (حروف کوچک ناهمسان) در هر ردیف، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

نتایج به‌دست آمده از تأثیر تیمارهای مختلف نمک صفراوی بر روی خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت باکتری‌های *پدیوکوکوس استیلسی*، *ویسلا سیباریا*، *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس کوریا* در برابر *باسیلوس سوبتیلیس* نیز نشان داد که با افزایش درصد نمک صفراوی در محدوده‌های مورد ارزیابی در این پژوهش، قابلیت بازدارندگی این پالیده‌ها افزایش یافت. به طوری‌که بیش‌ترین خاصیت بازدارندگی پالیده کشت باکتری‌های مورد نظر تحت تیمارهای نمک صفراوی، مربوط به تیمار نمک ۱ درصد و کم‌ترین مقدار آن نیز مربوط به تیمار نمک ۰/۳ درصد بود. آنالیز آماری نتایج به‌دست آمده نیز نشان داد جدول (۳) که بین خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت باکتری‌های اسید لاکتیک، تحت تیمارهای مختلف نمک با خاصیت آنتاگونیستی پالیده تیمار نشده آن‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p\leq ۰/۰۵$). هم‌چنین در اکثر موارد بین خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت باکتری‌های اسید لاکتیک با یکدیگر در هر تیمار نمک نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p\leq ۰/۰۵$).

بر اساس نتایج به‌دست آمده، ترکیبات ضدمیکروبی موجود در پالیده کشت این باکتری‌ها نه تنها نسبت به نمک صفراوی حساس نبودند بلکه با افزایش درصد

www.SID.ir

Archive of SID

نمک، خاصیت بازدارندگی آن‌ها افزایش یافت. هم‌چنین مقایسه درصد کاهش جمعیت *باسیلوس سوبتیلیس* تحت تأثیر تیمارهای مختلف نمک صفراوی نشان داد که با افزایش درصد نمک، خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت *لاکتوباسیلوس کوریا* در مقایسه با پالیده کشت سایر باکتری‌های اسید لاکتیک، کم‌تر و خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت *پدیوکوکوس استیلسی* در مقایسه با سایر باکتری‌های اسید لاکتیک، بیشتر تحت تأثیر قرار گرفتند. لذا ترکیبات بازدارنده موجود در پالیده کشت *لاکتوباسیلوس کوریا* به افزایش درصد نمک، حساسیت کمتری داشته و ترکیبات بازدارنده موجود در پالیده کشت *پدیوکوکوس استیلسی* به افزایش درصد نمک، حساسیت بیشتری از خود نشان دادند.

جدول (۳)- تأثیر تیمارهای مختلف نمک صفراوی بر خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی در مقایسه با پالیده تیمار نشده

تیمار پالیده	درصد کاهش جمعیت *باسیلوس سوبتیلیس* تحت تأثیر جدایه‌های لاکتیکی			
نمک (درصد)	*پدیوکوکوس استیلسی*	*ویسلا سیباریا*	*لاکتوباسیلوس برویس*	*لاکتوباسیلوس کوریا*
۰/۳	۷۷/۷۱۰±۰/٤٥۳^{Bb}	۷٦/۲٥٥±۰/۱۲۰^{Cc}	۸۱/۱۱٥±۰/۰٦٤^{Ca}	۸۱/٤۰۰±۰/۰۸٥^{Ca}
۰/٦	۷۹/۰۲٥±۰/۰٤۹^{ABc}	۷۷/۱۳۰±۰/۰۲۸^{Bd}	۸۳/٦۷٥±۰/۰٤۹^{Ba}	۸۲/۸٤۰±۰/۱٥٦^{Bb}
۱	۸۰/۲۲۰±۰/۲۸۳^{Ac}	۷۸/۰۷٥±۰/۱۳٤^{Ad}	۸۷/۰۱۰±۰/۳۱۱^{Aa}	۸٤/٥٥۰±۰/٦۹۳^{Ab}
پالیده تیمار نشده	۷٤/۸۳۰±۱/۰۰٤^{Cb}	۷۳/۱۰۰±۰/۱۷۰^{Db}	۸۰/۷۲٥±۰/۸٤۱^{Ca}	۸۰/٥۹٥±۰/۷۰۰^{Ca}

نتایج به‌صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار بیان شده است.

$^{A, B, C, D}$، (حروف بزرگ ناهمسان) در هر ستون و $^{a, b, c, d}$(حروف کوچک ناهمسان)، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

نتایج مربوط به تغییرات فراسنجه‌های خونی و آنزیم‌های کبدی موش‌های تغذیه شده با جدایه‌های لاکتیکی در جدول (٤) ارائه شده است. بر اساس داده‌های این جدول، در پایان ۲۸ روز تغذیه دهانی موش‌ها با باکتری‌های اسید لاکتیک، هیچ تفاوت معنی‌داری بین فاکتورهای خونی شامل WBC، RBC، PLT، MCV، MCH و MCHC در گروه‌های دریافت کننده باکتری‌های اسید لاکتیک با گروه کنترل مشاهده نشد. هم‌چنین سطوح آنزیم‌های کبدی ALP، ALT و AST در گروه‌های تغذیه شده با *لاکتوباسیلوس کوریا* و *پدیوکوکس استیلسی* در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری نداشتند اما با تغذیه دهانی *لاکتوباسیلوس برویس*، میزان آنزیم ALT و با تغذیه دهانی *ویسلا سیباریا*، میزان آنزیم‌های ALT و AST به شکل معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). البته لازم به‌ذکر است که مقادیر به‌دست آمده برای آنزیم‌های کبدی در تمام تیمارها در محدوده نرمال قرار داشت (محدوده نرمال برای ALP، ALT و AST، به‌ترتیب ۹٦-۳٥، ۷۷-۱۷ و۲۹۸-٥٤ واحد در لیتر می‌باشد) و بر این اساس، با خوراندن جدایه‌های لاکتیکی هیچ آسیبی به سلول‌های کبدی موش وارد نشده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول (٤)- بررسی تغییرات فراسنجه‌های خونی و آنزیم‌های کبدی موش تغذیه شده با جدایه‌های لاکتیکی

	موش تغذیه شده با				
	پدیوکوکوس استیلسی	*ویسلا سیباریا*	*لاکتوباسیلوس برویس*	*لاکتوباسیلوس کوریا*	گروه کنترل
فاکتورهای خونی					
شمارش گلبول سفید (10^3/µl)	٦/٤٧±٠/٣٦^a	٧/١٢±٠/١٤^a	٧/٠٨±٠/٠٣^a	٦/٦٦±٠/٤٥^a	٦/٦±٠/٦^a
شمارش گلبول قرمز (10^6/µl)	٦/٧٨±٠/٢٢^a	٦/٩٥±٠/٠٤^a	٦/٧٩±٠/٢^a	٦/٢٩±٠/١٧^a	٦/٤±٠/٤^a
شمارش پلاکت (10^3/µl)	٧٧٥±١٦^a	٧٩٢/٥±٣٢/٢٤^a	٨٠٥/٥±٤/٥^a	٧٨٤/٤٦±٤٤/٥^a	٧٥٧/٥٣±٥٧/٥^a
حجم متوسط گلبول‌های قرمز (fl)	٦١/٨٥±٢/٠٤^a	٦٣/٥٦±١/٤٤^a	٦٢/٩٩±٠/٩٩^a	٦٢/١٥±٠/٨٥^a	٦٢/٨٥±١/١٥^a
غلظت متوسط هموگلوبین (درصد)	٣٤/٥٨±٠/٥^a	٣٢/٦٣±١/٩٦^a	٣١/٢٩±١/١١^a	٣٢/٤٩±٠/٦٢^a	٣٤/٤٥±٠/٥٥^a
مقدار متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (pg)	٢٠/٢١±٠/٢٣^a	٢٠/٥٣±٠/١٤^a	٢٠/٥٩±٠/٤١^a	٢٠/٤٧±٠/٧٦^a	٢٠/٩٥±٠/٤٥^a
آنزیم‌های کبدی					
آلانین آمینوترانسفراز	٥٠/٧٦±٠/٧^b	٦٠/٧٢±١/٢٦^a	٥٦/١٩±١/٩٢^a	٥١/٥٨±٢/٦٦^b	٤٨/٢٣±٢/٩٩^b
آسپارتات آمینو ترانسفراز	٨١/٦٦±١/٨٢^{ab}	٩٨/١٤±٤/٣٣^a	٨٦/٧٤±٦/٨٣^{ab}	٩٤/٩٤±٦/٩٧^{ab}	٧٦/٨٧±٦/٣٩^b
آلکالین فسفاتاز	٦٤/١٩±٢/٢١^a	٦٧/٨٧±٥/٣٧^a	٦٠/٦٤±٥/٢٦^a	٥٨/٥٧±٩/٥٦^a	٥٩/٠٣±٦/٨٦^a

نتایج به‌صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار بیان شده است.

^{a,b}: حروف کوچک ناهمسان در هر ردیف، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری‌های اسید لاکتیک با تولید اسیدهای آلی و ترکیبات ضدمیکروبی دیگر نظیر باکتریوسین‌ها از رشد بسیاری از عوامل ناخواسته ممانعت می‌کنند (Vanderbergh, 1993). یافته‌های به‌دست آمده در پژوهش حاضر نیز نشان داد که پالیده کشت جدایه‌های *پدیوکوکوس استیلسی*، *ویسلا سیباریا*، *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس کوریا* قادر بودند از رشد *باسیلوس سوبتیلیس* ممانعت نمایند. علاوه بر این، اگر چه تیمارهای دما و pH سبب کاهش اثر بازدارنده پالیده کشت این جدایه‌های لاکتیکی شدند اما تیمار نمک صفراوی توانست اثر آنتاگونیستی آن‌ها را تقویت نمایند. تغییرات فراسنجه‌های خونی و آنزیم‌های کبدی موش آزمایشگاهی تغذیه شده با جدایه‌های لاکتیکی مذکور نیز ایمنی مصرف آن‌ها را تأیید نمود.

در مطالعات مختلفی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های لاکتیکی خمیرترش و پالیده کشت آن‌ها بر روی باکتری-های اسپورساز بیماری‌زا یا مولّد فساد مورد بررسی قرار گرفته است. به‌عنوان مثال، خاصیت آنتاگونیستی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس برویس* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* (*Pediococcus pentosaceus*) جدا شده از خمیرترش بر علیه *باسیلوس سوبتیلیس* (Katina *et al*., 2002) و اثر بازدارنده باکتری‌های اسید لاکتیک متعلق به جنس‌های *لاکتوباسیلوس* و *ویسلا* جدا شده از خمیرترش بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* (Pepe *et al*., 2003) ارزیابی شده

www.SID.ir

Archive of SID

است. در پژوهش دیگری نیز اثر ترکیبات شبه باکتریوسینی تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* (*Lactobacillus pentosus*) جدا شده از خمیرترش، بررسی و خاصیت ضدمیکروبی این ترکیبات تأیید گردیده است (Corsetti *et al.*, 2004). هم‌چنین بررسی خاصیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک خمیرترش بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس لیچنیفورمیس* (*Bacillus licheniformis*) مشخص نموده که جدایه‌های لاکتیکی خمیرترش بر روی شاخص‌های باکتریایی مذکور اثر بازدارنده داشته و خاصیت ضدمیکروبی بالای جدایه‌های لاکتیکی خمیرترش به دلیل تولید اسیدهای آلی و سایر متابولیت‌های ضد میکروبی آن‌ها است. هم‌چنین *لاکتوباسیلوس برویس*، *پدیوکوکوس* sp، *لاکتوباسیلوس لیندنری* (*Lactobacillus lindneri*) و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (*Lactobacillus delbrueckii*) از بین جدایه‌های لاکتیکی دارای بیشترین خاصیت ضدمیکروبی بودند (Simsek *et al.*, 2006). بررسی فعالیت بازدارندگی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس آلمنتاریوس* (*Lactobacillus alimentarius*) در مهار رشد *باسیلوس سوبتیلیس* مولّد روپینس نیز نشان داده است که سویه‌های لاکتوباسیل با تولید اسیدهای آلی، باکتریوسین‌ها و سایر متابولیت‌های ضدمیکروبی می‌توانند نقش مهمی در ممانعت از این فساد داشته باشند. مسلما استفاده از این جدایه‌های لاکتیکی به‌عنوان کشت آغازگر و یا کشت محافظ ممکن است به تولید مواد غذایی ایمن‌تر کمک نماید (Mentes *et al.*, 2007). محققین با بررسی خاصیت ضمیکروبی ترکیبات شبه باکتریوسینی تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (*Lactobacillus acidophilus*)، *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* و *لاکتوباسیلوس سیکی* (*Lactobacillus sakei*) جدا شده از خمیرترش بر علیه *باسیلوس سوبتیلیس* نشان دادند که پالیده کشت *لاکتوباسیلوس سیکی* از بیشترین اثر بازدارنده برخوردار بود (Digaitiene *et al.*, 2012). پژوهشگران دیگری نیز دریافتند که باکتریوسین تولیدی توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از خمیرترش دارای اثر مهارکنندگی بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* و افزایش زمان ماندگاری نان بود (Mohsen *et al.*, 2016).

بر اساس بخشی از یافته‌های پژوهش حاضر، خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی تحت تیمارهای مختلف pH کاهش یافت لذا احتمالا متابولیت‌های ضدمیکروبی موجود در پالیده کشت باکتری‌های مورد مطالعه به کاهش و هم‌چنین افزایش pH حساس بوده‌اند. نتایج مطالعات پژوهشگران بر روی خاصیت ضد باکتریایی پالیده کشت جدایه *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* نشان داد که این ویژگی تحت تأثیر pH=۲-۱۲ کاهش یافت (Todorov and Dicks, 2005). هم‌چنین مطالعه اثر آنتاگونیستی پالیده کشت جدایه *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی* (*Pediococcus acidilactici*) نیز نشان داد که خصوصیت مذکور در pH=۲-۱۰ با کاهش مواجه شد (Millette *et al.*, 2007). پژوهشگران با بررسی تأثیر pH بر خاصیت ضدباکتریایی پالیده کشت جدایه *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* دریافتند که این اثر بازدارنده در pH=۲-۱۲ حفظ گردید (Assefa *et al.*, 2008). مطالعات دیگر بر روی خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت جدایه *ویسلا*

www.SID.ir

Archive of SID

سیباریا نیز حاکی از آن بود که خاصیت ضدباکتریایی مذکور در pH اسیدی نسبت به شرایط قلیایی کمتر تحت تأثیر قرار گرفت (Li *et al*., 2015). صابونی شدن اسیدهای چرب تولیدی و یا تجزیه باکتریوسین‌ها و پپتیدهای ضدمیکروبی خصوصاً در pH قلیایی، عامل اصلی این تغییرات عنوان شده است. علاوه بر این در pH اسیدی، حلالیت برخی از متابولیت‌های ضدمیکروبی افزایش یافته و ظرفیت عبورشان از مناطق آبدوست سطح باکتری هدف افزایش می‌یابد. هم‌چنین به‌نظر می‌رسد که تأثیر pH معادل با شرایط زیستگاه طبیعی رشد جدایه‌های لاکتیکی بر تغییر خصوصیات ضدمیکروبی آن‌ها کم‌تر از شرایط به شدت اسیدی و یا قلیایی باشد (Juarez Tomas *et al*., 2002; Settanni *et al*., 2008). در پژوهش حاضر نیز خاصیت ضدمیکروبی پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی در pH مشابه خمیرترش، اسیدی معده و قلیایی روده به‌ترتیب با کاهش بیشتری نسبت به نمونه تیمار نشده مواجه گردید.

طبق نتایج پژوهش حاضر، خاصیت بازدارندگی پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی در تیمارهای دمایی مورد ارزیابی نیز عمدتا کاهش یافت. بر این اساس، احتمالا ترکیبات بازدارنده موجود در پالیده کشت باکتری‌های مورد مطالعه، نسبت به کاهش و افزایش دما حساس بودند اما در دمای یخچال نسبت به دمای پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون اثر بازدارنده خود را بیشتر حفظ نمودند. پژوهشگران با بررسی خاصیت بازدارنده پالیده کشت جدایه *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* گزارش کردند که ویژگی مذکور پس از تیمار حرارتی ۱۲۱ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ دقیقه کاهش یافت (Todorov and Dicks, 2005). محققین دیگری نیز طی ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی پالیده کشت *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی* نشان دادند که متابولیت‌های تولید شده توسط این جدایه لاکتیکی به حرارت، مقاوم بوده و فعالیت ضدباکتریایی خود را تا دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ دقیقه حفظ کردند (Millette *et al*., 2007). بررسی تأثیر دما بر خاصیت ضدباکتریایی پالیده کشت *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* نیز نشان داده است که متابولیت‌های تولید شده توسط این جدایه از پایداری حرارتی مناسبی برخوردار بودند به طوری‌که فعالیت بازدارندگی خود را تا دمای ۸۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ دقیقه حفظ کردند (Assefa *et al*., 2008). پژوهشگران هم‌چنین پس از ارزیابی اثر آنتاگونیستی جدایه *ویسلا سیباریا* گزارش نمودند که پالیده کشت این جدایه از پایداری حرارتی مناسبی برخوردار بوده و حرارت ۱۰۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه تأثیر چندانی بر فعالیت ضدباکتریایی آن نداشت (Li *et al*., 2015). بر این اساس، احتمالاً غیرفعال شدن ترکیبات بازدارنده حساس به حرارت نظیر برخی از باکتریوسین‌ها و پپتیدهای ضدمیکروبی خصوصا در دماهای بالا در این امر نقش دارند (Juarez Tomas *et al*., 2002; Settanni *et al*., 2008).

هم‌چنین نتایج به‌دست آمده از تأثیر تیمارهای مختلف نمک صفراوی بر روی خاصیت آنتاگونیستی پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی در پژوهش حاضر نشان داد که پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی نه تنها نسبت به نمک صفراوی حساس نبودند بلکه با افزایش درصد نمک در محدوده مورد ارزیابی، اثر بازدارندگی آن‌ها در مقایسه با پالیده تیمار نشده افزایش یافت. با توجه به

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج پژوهش‌های صورت گرفته، وجود نمک باعث تشدید فعالیت ضدمیکروبی پپتیدهای کوچک می‌شود (Rozes and Peres, 1996). طبق نتایج به‌دست آمده از مطالعات محققین مختلف نیز میزان متوسط نمک (۲-۱ درصد) نه تنها سبب بهبود رشد جدایه‌های لاکتیکی شده بلکه فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین‌های تولید شده توسط آن‌ها را نیز افزایش می‌دهد (Leroy and De Vuyst, 1999; Neysens *et al*., 2003). مطالعات اخیر نیز نشان داده است که حضور نمک به‌طور قابل توجهی باعث افزایش فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک می‌شود (Noordiana *et al*., 2013). دلیل این تغییرات نیز عمدتاً تجزیه ترکیبات دارای خاصیت ضدمیکروبی به اجزاء مؤثرتر تحت تیمار نمک عنوان شده است (Neysens *et al*., 2003; Noordiana *et al*., 2013).

در پژوهش حاضر هم‌چنین تغییرات فراسنجه‌های خونی و آنزیم‌های کبدی موش تغذیه شده با جدایه‌های لاکتیکی نیز در محدوده نرمال قرار داشت که ایمنی مصرف باکتری‌های اسید لاکتیک مذکور را تأیید نمود. بر اساس نتایج پژوهش‌های صورت گرفته، تغذیه دهانی هم‌زمان موش با *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به‌مدت ۲۸ روز، هیچ تأثیر معنی‌داری بر روی فاکتورهای خونی و آنزیم‌های کبدی نداشته و بر این اساس، ایمنی مصرف این باکتری‌ها تأیید گردیده است (Tsai *et al*., 2014). محققین هم‌چنین با تغذیه ۲۸ روزه موش با *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* دریافتند که مصرف باکتری مذکور فاقد هرگونه اثر سمی بود (Szabo *et al*., 2011).

با در نظر گرفتن عوارض ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر نگهدارنده‌های سنتزی در زنجیره فرآوری مواد غذایی و هم‌چنین با توجه به ایمنی مصرف جدایه‌های لاکتیکی مورد ارزیابی در این پژوهش و حفظ قابلیت آنتاگونیستی آن‌ها تحت تیمارهای دما، pH و نمک در برابر *باسیلوس سوبتیلیس* به‌عنوان یکی از باکتری‌های اسپورساز شاخص در فراورده‌های مختلف غذایی می‌توان از پالیده کشت این باکتری‌های اسید لاکتیک به‌عنوان نگهدارنده زیستی در صنایع غذایی و دارویی بهره برد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولین محترم شرکت دانش‌بنیان «زیست فناوران غذای فراسودمند» مستقر در مرکز رشد واحدهای فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که بخشی از هزینه‌های اجرای این پژوهش را تأمین نمودند سپاسگزاری می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

• Assefa, E., Beyene, F., Santhanam, A. (2008). Effect of temperature and pH on the antimicrobial

www.SID.ir

Archive of SID

activity of inhibitory substances produced by lactic acid bacteria isolated from Ergo, an Ethiopian traditional fermented milk. African Journal of Microbiology Research, 2(9): 229-234.

- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskericius, A., Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. Food Control, 31(2): 539-545.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Smacchi, E. (1996). Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. Food Microbiology, 13(6): 447-456.
- Corsetti, A., Settanni, L., Van Sinderen, D. (2004). Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their *in vitro* and *in situ* activity. Journal of Applied Microbiology, 96(3): 521-534.
- Digaitiene, A., Hansen, A.S., Juodeikiene, G., Eidukonyte, D., Josephsen, J. (2012). Lactic acid bacteria isolated from rye sourdoughs produce bacteriocin-like inhibitory substances active against *Bacillus subtilis* and fungi. Journal of Applied Microbiology, 112(4): 732-742.
- Havelaar, A.H., Brul, S., Jong, A.D., Jonge, R.D., Zwietering, M.H., ter Kuile, B.H. (2010). Future challenges to microbial food safety. International Journal of Food Microbiology, 139: S79-S94.
- Juarez Tomas, M.S., Bru, E., Wiese, B., de Ruiz Holgado, A.A.P, Nader-Macıas, M.E. (2002). Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. Journal of Applied Microbiology, 93(4): 714-724.
- Katina, K., Sauri, M., Alakomi, H.L., Sandholm, T.M. (2002). Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. LWT-Food Science and Technology, 35(1): 38-45.
- Katina, K. (2005). Sourdough a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread. VTT Technology Research Center of Finland. 569: 13-41.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Visconti, A. (2003). Antifungal activity of phenyl lactic acid against molds isolated from bakery products. Applied and Environmental Microbiology, 69(1): 634-640.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science & Technology, 15(2): 67-78.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (1999). The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC494, a potential starter culture for sausage fermentation. Applied and Environmental Microbiology, 65(12): 5350-5356.
- Li, D., Ni, K., Pang, H., Wang, Y., Cai, Y., Jin, Q. (2015). Identification and antimicrobial activity detection of lactic acid bacteria isolated from corn stover silage. Asian Australians Journal of Animal Science, 28(5): 620-631.
- Mentes, O., Ercan, R., Akcelik, M. (2007). Inhibitor activities of two *lactobacillus* strains, isolated from sourdough, against rope forming *bacillus* strains. Food Control, 18(4): 359-363.
- Messens, W., De Vuyest, L. (2002). Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdough- a review. International Journal of Food Microbiology, 72(1-2): 31-43.
- Millette, M., Dupon, C., Archambault, D., Lacroix, M. (2007). Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. Journal of Applied Microbiology, 102(1): 274-282.
- Mohsen, S.M., Aly, M.H., Attia, A.A., Osman, D.B. (2016). Effect of sourdough on shelf life, freshness and sensory characteristics of Egyptian balady bread. Journal of Applied and Environmental Microbiology, 4(2): 39-45.
- Neysens, P., Messens, W., De Vuyst, L. (2003). Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. International Journal of Food Microbiology, 88(1): 29-39.
- Noordiana, N., Fatimah, A.B., Mun, A.S. (2013). Antibacterial agents produced by lactic acid bacteria isolated from threadfin salmon and grass shrimp. International Food Research Journal, 20(1): 117-124.

www.SID.ir

Archive of SID

- Pepe, O., Blaiotta, G., Moschetti, G., Greco, T., Villani, F. (2003). Rope producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 69(4): 2321-2329.
- Rozes, N., Peres, C. (1996). Effect of oleuropein and sodium chloride on viability and metabolism of *Lactobacillus plantarum*. Applied Microbiology and Biotechnology, 45(6): 839-843.
- Sadeghi, A., Raeisi, M., Ebrahimi, M. (2017). Sourdough: functional feathers and healthy benefits. Golestan University of Medical Sciences Press, 35-57, ISSN 97860095473-33 [In Persian].
- Settanni, L., Valmorri, S., Suzzi, G., Corsetti, A. (2008). The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains. Food Microbiology, 25(5): 722-728.
- Simsek, O., Hilmi Con, A., Tumuloglu, S. (2006). Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough process. Food Control, 17(4): 263-270.
- Suskovic, J., Kos, B., Beganovic, J., Pavunc, A.L., Habjanic, K., Matosic, S. (2010). Antimicrobial activity, the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. Food Technology and Biotechnology, 48(3): 296-307.
- Szabo, N.J., Dolan, L.C., Burdock, G.A., Shibano, T., Sato, S., Suzuki, H., *et al*. (2011). Safety evaluation of *Lactobacillus pentosus* strain b240. Food Chemistry and Toxicology, 49(1): 251-258.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. (2005). Pediocin ST18, an anti *Listerial* bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. Process Biochemistry, 40(1): 365-370.
- Tsai, C.C., Leu, S.F., Huang, Q.R., Chou, L.C., Huang, C.C. (2014). Safety evaluation of multiple strains of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* in wistar rats based on the Ames test and a 28-day feeding study. Science World Journal, 2014: 1-9.
- Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S.L., Visconti, A., Lavermicocca, P. (2008). Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread-making to prevent *Bacillus subtilis* ropy spoilage. International Journal of Food Microbiology, 122(3): 328-332.
- Vanderbergh, P.A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiology Review, 12(1-3): 221-237.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Food Hygiene, Vol. 9, No. 34, Summer 2019

Effects of pH, temperature and salt on antagonistic activity of barley sourdough lactic acid bacteria on *Bacillus subtilis* and evaluation of serum parameters and liver enzymes in mice fed with LAB isolates

Ebrahimi, M.[1], Khashaie, M.[2], KiaDaliri, F.[3], Sadeghi, A.[4]*

1. Assistant Professor, Cereal Health Research Centre, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran
2. M.Sc Graduate of Food Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. M.Sc Graduate of Food Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
4. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

*Corresponding author**:** sadeghi.gau@gmail.com

(Received: 2019/3/4 Accepted: 2019/7/10)

Abstract

In this experimental study, the effect of pH (2, 4, 11), temperature (4, 85, 121 ºC) and bile salt (0.3, 0.6, 1%) treatments on inhibitory potential of cell-free supernatant (CFS) obtained from barley sourdough dominant LAB (*Pediococcus stilesii*, *Weissella cibaria*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus curieae*) isolates, against *B. subtilis* were investigated based on microdilution method in comparison to untreated CFS. The safety of LAB isolates was also assessed by control of changes in serum parameters and liver enzymes in mice fed with them. Results were analyzed by one-way analysis of variance. Based on results, LAB CFS had antagonistic activity against *B. subtilis*. Inhibitory effects of the CFS under pH and temperature treatments were decreased, but under bile salt treatment was increased. Changes in serum parameters and liver enzymes in mice fed with LAB isolates were also in normal ranges and so on, safety of the LAB isolates was approved. By considering the antagonistic activity of LAB CFS under pH, temperature and salt treatments, against *B. subtilis* it is possible to use from the CFS as a biopreservative in food processing chain.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: LAB isolates, biopreservative, sourdough

www.SID.ir