

[10.30495/JFH.2020.671043](https://doi.org/10.30495/JFH.2020.671043)

«مقاله پژوهشی»

ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی و ضدقارچی باکتری اسیدلاکتیک غالب جداشده از خمیرترش جو دوسر

فهیمه حاجی‌نیا^۱، علیرضا صادقی^{۲*}، علیرضا صادقی ماهونک^۳، مرتضی خمیری^۴، یحیی مقصدلوه^۵، علی مؤیدی^۶

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌فناوری مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳. استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۴. استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۵. استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۶. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

*مسئول مکاتبات: Sadeghi.gau@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۸/۹/۱۷ پذیرش نهایی: ۹۸/۱۱/۸)

چکیده

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از انواع خمیرترش به منظور تأمین کشت‌های میکروبی مورد استفاده در صنایع تخمیری از اهمیت بسزایی برخوردار است. در این پژوهش، باکتری اسیدلاکتیک غالب با تکرار فرایند مایه‌گیری از خمیرترش جو دوسر، جداسازی و با استفاده از PCR (Polymerase chain reaction) شناسایی گردید. سپس ویژگی‌های پروبیوتیکی و همچنین اثر ضدقارچی این جدایه لاکتیکی روی *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*) مورد مطالعه قرار گرفت. توالی‌یابی محصولات PCR منجر به شناسایی پدیوکوکوس پنتازاسئوس (*Pediococcus pentosaceus*) به عنوان جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش جو دوسر شد. نرخ زنده‌مانی جدایه مذکور پس از تیمار متوالی اسید و صفرا در مقایسه با نمونه شاهد ۵۹/۸۰ درصد بود. همچنین اثر ضدباکتریایی آن در برابر *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) نسبت به سایر عوامل بیماری‌زای مورد مطالعه به شکل معنی‌داری ($p < 0.05$) بیشتر بود. رومانند خام فاقد سلول (Crude cell-free supernatant) جدایه لاکتیکی نیز به‌طور کامل از رشد *باسیلوس سرئوس* ممانعت نمود اما رشد *سالمونلا انتریکا* (*Salmonella enterica*) را ۶۸/۶۵ درصد کاهش داد. با این حال، رومانند فاقد سلول (Cell-free supernatant) ختنی شده جدایه لاکتیکی، اثر بازدارنده‌ای روی این باکتری‌ها نداشت. علاوه بر این، جدایه لاکتیکی از قابلیت دگر اتصالی (Co-aggregation) مناسبی با *شریشیا کولای* (*Escherichia coli*) برخوردار بود و به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید و ونکومایسین، مقاومت نشان داد. این جدایه لاکتیکی، فاقد فعالیت همولیتیکی بود و اثر ضدقارچی آن در برابر *آسپرژیلوس نایجر* نیز مورد تأیید قرار گرفت. بر این اساس، جدایه پدیوکوکوس پنتازاسئوس از قابلیت مناسبی برای استفاده به عنوان کشت پروبیوتیک و یا نگه‌دارنده در صنایع تخمیری برخوردار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اثر ضدقارچی، جدایه لاکتیکی غالب، خصوصیات پروبیوتیکی، خمیرترش جو دوسر

مقدمه

باکتریوسین‌ها، پپتیدهای دارای وزن مولکولی پایین و پروتئین‌های ضدقارچی است (Serwin, 2004). پروبیوتیک‌ها میکروارگانسیم‌های زنده و فعالی هستند که وقتی در مقادیر کافی مصرف می‌شوند، باعث ایجاد اثرات سلامتی‌بخش در میزبان می‌گردند (Andrabi et al., 2016). این میکروارگانسیم‌ها خاصیت ضد میکروبی، مقاومت به اسید و صفرا، اتصال به سطوح مخاطی، فعالیت آنتاگونیستی علیه عوامل بیماری‌زا و عدم قابلیت انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک برخوردارند (Kumar Bajaj et al., 2015; Andrabi et al., 2016). جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها و نگه‌دارنده‌های سنتزی در پیشگیری و درمان عوارض بسیاری از عوامل عفونی و بیماری‌زای دستگاه گوارش نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (Saarela et al., 2000; Saad et al., 2013). محققین پس از ارزیابی ۲۳ خمیرترش محلی به‌عنوان منبع جداسازی میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک دریافتند که از بین تمام جدایه‌های میکروبی، اتروکوکوس *موندتی* (*Enterococcus mundtii*) در مقایسه با سایر باکتری‌های اسیدلاکتیک تجزیه‌کننده گلوتن، دارای توانایی تحمل pH پایین و نمک صفراوی و همچنین دارای آب‌گریزی مناسبی در دیواره سلولی خود بود (Sakandar et al., 2018). طی پژوهشی که روی خصوصیات ضدقارچی و فعالیت ضدباکتریایی ۱۵ گونه از باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از خمیرترش صورت گرفت، مشخص شد که برخی از باکتری‌های مذکور، دارای فعالیت ضدقارچی روی *آسپرژیلوس نایجر* و فعالیت ضدباکتریایی در برابر باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد بودند (Demirbaş et al., 2017).

باکتری‌های اسیدلاکتیک، به‌عنوان باکتری‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و غیراسپورزا به نحو گسترده‌ای در فراورده‌های غذایی تخمیری و زیستگاه‌های طبیعی وجود دارند. این باکتری‌ها عمدتاً به‌عنوان کشت‌های آغازگر برای تخمیر غذاهای مختلف مورد استفاده قرار گرفته و می‌توانند ایمنی، ماندگاری، ارزش غذایی، عطر و طعم و کیفیت کلی محصولات تخمیر شده را بهبود دهند (Capozzi et al., 2012). تخمیر غلات توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک، سبب کاهش pH و تولید اسیدهای آلی می‌گردد. از طرفی محتوای اسیدلاکتیک در فراورده‌های تولیدی می‌تواند بر قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های اسیدلاکتیک، خواص حسی و همچنین پذیرش مصرف‌کننده مؤثر باشد (Luana et al., 2014).

به سیستم بیولوژیکی پیچیده حاصل از تخمیر آرد غلات یا اجزاء آن با آب، خمیرترش گفته می‌شود که اساس تشکیل آن همزیستی بین باکتری‌های اسیدلاکتیک و مخمرهاست. خمیرترش می‌تواند به‌عنوان یک منبع غنی از باکتری‌های اسیدلاکتیک با ویژگی‌های منحصربه‌فرد فناوری و پروبیوتیکی در نظر گرفته شود (Manini et al., 2016). این باکتری‌ها با داشتن خاصیت ضد میکروبی نه‌تنها سبب کاهش رشد و گسترش میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا و عامل فساد می‌شوند بلکه می‌توانند متابولیت‌ها و سموم تولیدشده توسط آن‌ها را نیز بی‌اثر کنند. فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک ناشی از تولید انواع مواد بازدارنده نظیر اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن،

درصد پروتئین و ۱/۲۵ درصد خاکستر بود. تخمیر تصادفی جو دوسر (بدون افزودن کشت آغازگر) از مخلوط ۱۰۰ گرم آرد جو دوسر و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل با بازده خمیر (نسبت خمیر به آرد $100 \times$) معادل ۲۰۰ در ظروف استریل تهیه شد. سپس مخلوط مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردید. فرایند مایه گیری (افزودن ۲۵ درصد از خمیرترش روز قبل به خمیرترش تولیدی) تا رسیدن به ثبات اسیدیته قابل تیتراژ، طی تکرارهای متوالی ادامه یافت (Hüttner et al., 2010).

- جداسازی و شناسایی باکتری اسیدلاکتیک غالب

از رقت سازی متوالی و کشت سطحی خمیرترش حاصل از آخرین مایه گیری در محیط کشت اختصاصی agar (MRS) De Man, Rogosa and Sharpe استفاده شد. سپس روی پرگنه های خالص به دست آمده رنگ آمیزی گرم و فعالیت کاتالازی بررسی شدند. ادامه DNA جدایه لاکتیکی، با کیت استخراج (Bioneer, AccuPrep K-3032, South Korea) و توسط PCR (Polymerase chain reaction) با پرایمرهای F44 و R1543، تکثیر (۳۰ چرخه حرارتی اصلی شامل واسرشت در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه) و متعاقباً محصولات PCR (توالی ۱۵۰۰ جفت بازی از جایگاه $rDNA$ ۱۶S)، توالی یابی (Bioneer, South Korea) گردید. برای تأیید اولیه تکثیر، محصولات PCR به ژل آگارز ۱/۵ درصد، منتقل و در بافر TBE در حضور نمونه های کنترل مثبت (حاوی DNA استخراج شده از باکتری اسیدلاکتیک کلکسیونی)

پژوهشگران دیگری نیز به مطالعه خواص باکتری های اسیدلاکتیک جدا شده از خمیرترش سبوس گندم پرداختند. نتایج پژوهش این محققین نشان داد که از بین جدایه های مورد مطالعه، لاکتوباسیلوس پلانتروم (*Lactobacillus plantarum*) و پیدیکوکوس پنتازاسئوس (*Pediococcus pentosaceus*) دارای خاصیت ضدقارچی مناسبی بودند و در نهایت پیدیکوکوس پنتازاسئوس به عنوان باکتری پروبیوتیک معرفی گردید (Manini et al., 2016).

در پژوهش حاضر، پس از جداسازی باکتری اسیدلاکتیک غالب خمیرترش جو دوسر، خصوصیات پروبیوتیکی و ضدقارچی جدایه مذکور مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

میکروارگانیزم های مورد استفاده در این مطالعه شامل اشریشیا کولای (*Escherichia coli*, PTCC 1399)، استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112)، باسیلوس سرئوس (PTCC 1015)، سالمونلا انتریکا (PTCC 1709) و اسپرژیلوس نایجر (PTCC 5012) از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران (IROST, Iran) تهیه شدند. محیط های کشت میکروبی و مواد شیمیایی مصرفی نیز از شرکت (Merck, Germany) خریداری گردیدند.

- تخمیر تصادفی جو دوسر

پس از تهیه آرد جو دوسر (مخلوطی از چند واریته)، ویژگی های آن بر اساس روش های استاندارد تعیین گردید (AACC, 2010). بر این اساس، آرد جو دوسر مورد استفاده حاوی ۶/۶۳ درصد چربی، ۷/۷۸

انتریک) قرار داده شده بودند. نهایتاً پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند و قطر هاله عدم رشد با نرم‌افزار Image J (نسخه 1.42e) اندازه‌گیری شد (Reller et al., 2009).

- ارزیابی اثرات ضدباکتریایی رومانده فاقد سلول (Cell-free supernatant) جدایه لاکتیکی

رومانده فاقد سلول جدایه لاکتیکی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی انتخابی (که بیشترین اثر بازدارنده جدایه لاکتیکی در مرحله قبل در برابر آن‌ها مشاهده شده بود) از روش میکرودیلوژن و کشت در میکروپلیت با محیط کشت MRS broth استفاده شد. سپس این میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد و نهایتاً توسط دستگاه خوانشگر میکروپلیت (SCO, MPR01, Germany) در طول موج ۶۲۰ نانومتر جذب‌سنجی صورت گرفت (Reller et al., 2009).

- قابلیت خود اتصالی و دگر اتصالی (Auto and co-aggregations)

برای ارزیابی قابلیت خود اتصالی جدایه لاکتیکی ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی در محیط کشت MRS broth در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. سپس جذب نوری سوسپانسیون در زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد و نهایتاً میزان قابلیت خود اتصالی بر اساس رابطه ذیل محاسبه گردید. در این رابطه A_t مقدار جذب پس از ۲۴ ساعت و A_0 مقدار جذب در زمان صفر است (Collado et al., 2008).

$$[1-(A_t/A_0)] \times 100$$

و کنترل منفی (فاقد DNA)، الکتروفورز انجام شد. محصولات PCR پس از توالی‌یابی با استفاده از رویه Blast با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI هم‌ردیف گردیدند (Abnous et al., 2009).

- مقاومت جدایه لاکتیکی به اسید و صفرا

ابتدا جمعیت جدایه لاکتیکی به 10^8 تعداد واحد تشکیل‌دهنده پرگنه بر میلی‌لیتر (CFU/mL)، معادل نیم مک فارلند تنظیم گردید. سپس pH محیط کشت حاوی این جمعیت باکتریایی با استفاده از اسیدکلریدریک ۱ نرمال به حدود ۲ رسانده شد. در ادامه، سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۱/۵ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. سپس سوسپانسیون مذکور به مدت ۱/۵ ساعت در مجاورت نمک صفراوی با غلظت ۰/۳ درصد و pH معادل ۶ قرار داده شد. در مرحله بعد، رقت‌های متوالی از محلول مذکور در رینگر استریل، تهیه و به صورت سطحی روی محیط کشت MRS agar کشت داده شد. نهایتاً تعداد باکتری زنده پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در مقایسه با نمونه شاهد (بدون تیمار اسید و صفرا) مشخص شد (Rolim et al., 2015).

- اثرات ضدباکتریایی جدایه به روش انتشار دیسکی

پس از کشت جدایه لاکتیکی و باکتری‌های شاخص غذازاد در محیط کشت اختصاصی، جمعیت آن‌ها به 10^8 CFU/mL رسانده شد. سپس ۴۰ میکرولیتر از جدایه لاکتیکی روی دیسک‌های کاغذی استریل (Padtan Teb, Iran) منتقل گردید که در سطح محیط کشت Brain Heart Infusion (BHI) agar حاوی کشت سطحی باکتری‌های شاخص (شریشیا کولای، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و سالمونلا

دمای ۳۷ درجه سلسیوس، ایجاد هاله و تغییر رنگ در محیط کشت بررسی شد (Angmo *et al.*, 2016).

- اثر ضدقارچی

برای این منظور از روش کشت دولایه در برابر *آسپرژیلوس نایجر* استفاده گردید. در این روش از کشت فعال جدایه لاکتیکی، خطوطی به اندازه ۳ سانتی متر با فاصله متناسب از یکدیگر در مرکز پلیت های حاوی محیط کشت MRS agar کشت داده و به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس از مخلوط سوسپانسیون اسپور قارچ با تعداد 10^5 اسپور بر میلی لیتر به همراه محیط کشت Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) agar روی خطوط کشت داده شده جدایه لاکتیکی، ریخته و پس از انعقاد لایه دوم، پلیت ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سرانجام قطر هاله عدم رشد قارچ در اطراف خطوط کشت جدایه لاکتیکی تعیین گردید (Magnusson *et al.*, 2003).

- آنالیز آماری

نتایج حاصل از این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی به روش آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. تمامی آزمون ها در سه تکرار انجام شده و برای آنالیز داده ها از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۰) و برای ترسیم نمودارها از Excel 2016 استفاده گردید. مقایسه میانگین ها نیز با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی داری (LSD) در سطح $p < 0.05$ انجام گرفت.

برای ارزیابی خاصیت اتصال جدایه لاکتیکی انتخابی علیه *شریشیا کولای*، مخلوطی از حجم های مساوی از سوسپانسیون جدایه لاکتیکی انتخابی و سوسپانسیون باکتری بیماری زای مورد نظر (مجموع ۴ میلی لیتر حاوی 10^8 CFU/mL از هر باکتری) تهیه گردید. مخلوط مذکور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت نگهداری شد. سپس جذب هر سوسپانسیون (جدایه لاکتیکی، *شریشیا کولای* و مخلوط آنها) در 600 نانومتر خوانده شده و بر اساس رابطه ذیل، میزان خاصیت دگر اتصالی محاسبه گردید. در این رابطه A_p جذب سوسپانسیون باکتری شاخص، A_{lac} جذب سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و A_{mix} جذب مخلوط سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و باکتری شاخص می باشد (Zhang *et al.*, 2011).

$$[(A_p + A_{lac})/2 - (A_{mix})]/(A_p + A_{lac})/2 \times 100$$

- مقاومت آنتی بیوتیکی

مقاومت جدایه ها در برابر آنتی بیوتیک های استرپتومایسین، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، ونکومایسین، سفازولین، سفتریاکسون، سفالوتین، آمپی سیلین، ایمپنم و پنی سیلین با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیک (Padtan Teb, Iran) و بررسی هاله عدم رشد در اطراف دیسک ها مورد ارزیابی قرار گرفت (Rojo-Bezares *et al.*, 2006).

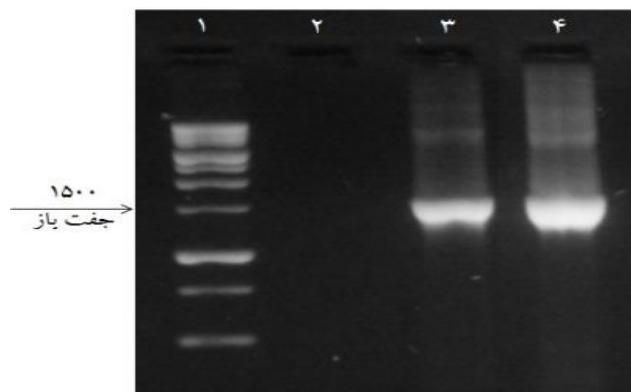
- قابلیت همولیز خون

برای این منظور، جدایه لاکتیکی بر سطح محیط کشت Blood agar حاوی ۵ درصد خون گوسفندی، کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در

یافته‌ها

بعد از چهار روز تکرار فرایند مایه‌گیری، اسیدیته قابل تیتراژ خمیرترش به ثبات (۱۸/۵) رسید. جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش آرد جو دوسر نیز یک کوکسی گرم مثبت، کاتالاز منفی بود که تکثیر توالی هدف ۱۵۰۰ جفت بازی از ژنوم آن توسط ژل الکتروفورز

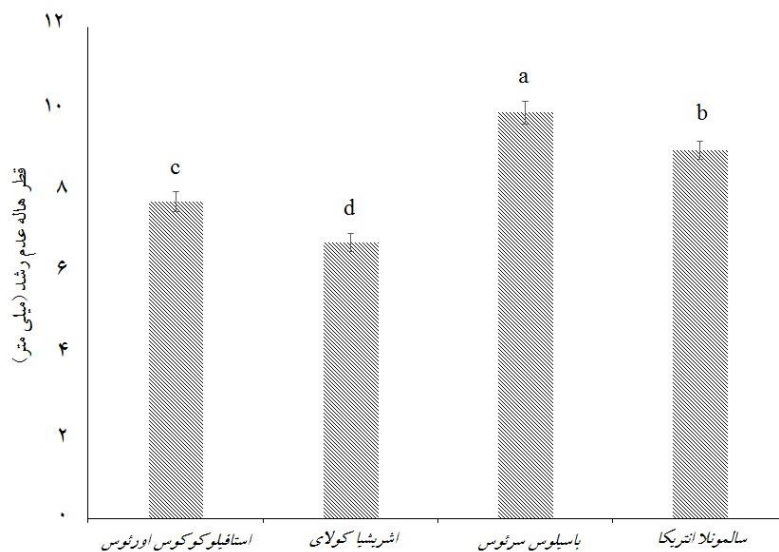
محصولات PCR مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱). توالی‌یابی محصولات PCR در مقایسه با داده‌های موجود در بانک جهانی ژن نیز منجر به شناسایی پدیوکوکوس پنتازاسئوس (۹۸ درصد تشابه) به‌عنوان جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش جو دوسر شد.



شکل (۱) - ژل الکتروفورز محصولات PCR. لاین ۱: لدر یک کیلو جفت‌بازی، لاین ۲: کنترل منفی، لاین ۳: جدایه لاکتیکی، لاین ۴: کنترل مثبت.

باکتریایی مورد مطالعه به شکل معنی‌داری ($p < 0.05$) متفاوت بود. این اثر به ترتیب روی باسیلوس سرئوس، سالمونلا انتریکا، استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کولای کاهش یافت.

زنده‌مانی جدایه لاکتیکی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش ($5/00 \text{ Log CFU/mL}$) در مقایسه با نمونه کنترل ($8/36 \text{ Log CFU/mL}$) معادل $\pm 0/50$ ۵۹/۸۰ درصد بود. نتایج آزمون ضدباکتریایی جدایه لاکتیکی در نمودار (۱) نشان داده شده است. اثر بازدارندگی جدایه لاکتیکی روی هر چهار شاخص



نمودار (۱)- قطر هاله عدم رشد شاخص های باکتریایی در حضور جدایه لاکتیکی. حروف ناهمسان، نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p < 0/05$ می باشد. این داده ها میانگین سه تکرار هستند.

اثر رومانند خنثی شده روی دو شاخص باکتریایی مورد مطالعه، تفاوت معنی داری نداشت. همچنین اثر ضدباکتریایی رومانند فاقد سلول خام جدایه لاکتیکی روی هر دو شاخص باکتریایی به شکل معنی داری بیشتر از رومانند فاقد سلول خنثی شده بود.

نتایج به دست آمده از اثر ضدباکتریایی رومانند فاقد سلول جدایه لاکتیکی در جدول (۱) مشاهده می شود. بر این اساس اثر ضدباکتریایی رومانند فاقد سلول خام جدایه لاکتیکی روی باسیلوس سرئوس به شکل معنی داری ($p < 0/05$) بیشتر از سالمونلا انتریکا بود اما

جدول (۱)- اثر بازدارنده رومانند خام و خنثی شده حاصل از کشت جدایه لاکتیکی در برابر شاخص های انتخابی (درصد)

سالمونلا انتریکا	باسیلوس سرئوس	رومانند فاقد سلول
$68/65 \pm 0/50$ Ab	100 ± 0 Aa	خام
0 ± 0 Ba	0 ± 0 Ba	خنثی شده

حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در هر ردیف و ستون، نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p < 0/05$ است.

سیپروفلوکوساسین، نالیدیکسیک اسید و ونکومایسین، مقاوم و نسبت به سفازولین، سفتریاکسون، سفالوتین و آمپی سیلین، حساس بود. همچنین جدایه مذکور نسبت به ایمی پنم و پنی سیلین، حساسیت نسبی نشان داد.

بر اساس نتایج به دست آمده، میزان قابلیت خود اتصالی جدایه لاکتیکی ۲۷ درصد و قابلیت دگر اتصالی آن با اشریشیا کولای ۶۶ درصد بود. نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه لاکتیکی در جدول (۲) آمده است. بر این اساس جدایه لاکتیکی در برابر استرپتومایسین،

جدول (۲) - مقاومت جدایه لاکتیکی در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج

آنتی‌بیوتیک (میکروگرم ماده مؤثره)	میزان حساسیت	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)
سفازولین (۳۰)	حساس	۲۸/۹۰ ± ۰/۳۸ ^a
استرپتومایسین (۱۰)	مقاوم	۷/۳۶ ± ۰/۰۳ ^d
سیپروفلوکساسین (۵)	مقاوم	۷/۳۵ ± ۰/۱۴ ^d
ایمی‌پنم (۱۰)	حساسیت نسبی	۱۸/۱۵ ± ۲/۶۰ ^c
پنی‌سیلین (۱۰)	حساسیت نسبی	۱۶/۶۷ ± ۱/۴۹ ^c
نالیدیکسیک اسید (۳۰)	مقاوم	۷/۰۵ ± ۰/۱۴ ^d
ونکومایسین (۳۰)	مقاوم	۶/۹۷ ± ۰/۰۹ ^d
سفتریاکسون (۳۰)	حساس	۲۲/۳۶ ± ۱/۱۲ ^b
سفالوتین (۳۰)	حساس	۲۶/۵۵ ± ۲/۴۹ ^a
آمپی‌سیلین (۱۰)	حساس	۲۸/۱۰ ± ۰/۳۶ ^a

حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ می‌باشد. این داده‌ها میانگین سه تکرار هستند.

از چهار روز گرمخانه‌گذاری در مقایسه با نمونه کنترل (شکل ۲)، مشهود بود به‌نحوی که این جدایه ۱۵/۲۰ ± ۰/۳۴ درصد از رشد قارچ جلوگیری کرد.

نتایج پژوهش نشان داد که جدایه لاکتیکی مورد مطالعه، فاقد هرگونه فعالیت همولیزی بود. اثر ضدقارچی جدایه لاکتیکی روی *آسپرژیلوس نایجر* بعد



شکل (۲) - اثر ضدقارچی جدایه لاکتیکی در برابر *آسپرژیلوس نایجر* به‌روش کشت دولایه (ب) در مقایسه با نمونه کنترل (الف)

بحث و نتیجه‌گیری

گونه غالب خمیرترش جو دوسر پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس *لاکتوباسیلوس کورینی فورمیس* (*Lactobacillus coryniformis*) گزارش گردید (Hüttner et al., 2010). در پژوهش دیگری نیز خمیرترش جو دوسر را با بازده خمیر ۲۰۰ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس با ۱۰ درصد مایه‌گیری تهیه

در تحقیق حاضر، پدیدوکوکوس پنتازاسئوس جدا شده به‌عنوان جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش جو دوسر دارای قابلیت‌هایی نظیر اثرات ضدمیکروبی، توانایی زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش و الگوی آنتی‌بیوتیکی مناسب بود. طی مطالعات اخیر،

پدیوکوکوس پنتازاسئوس پژوهش حاضر دارای ۵۹/۸۰ درصد قابلیت زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش بود. نتایج مطالعات محققین نشان داد که پدیوکوکوس پنتازاسئوس جدا شده از خمیرترش سبوس گندم در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش، زنده‌مانی قابل‌قبولی (کاهش از ۷/۴ به Log ۳/۴ CFU/mL در pH معادل ۲/۵ و کاهش از ۷/۱ به Log ۳/۹ CFU/mL در غلظت ۰/۳ درصد صفر) داشت (Manini et al., 2016). همچنین دریافتند که جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو به‌ویژه لاکتوباسیلوس برویس (*Lactobacillus brevis*) و پدیوکوکوس پنتازاسئوس دارای توانایی زنده‌مانی مناسبی (به ترتیب ۸۳/۲۰ و ۴۸/۴۰ درصد در pH معادل ۲ و ۸۶/۳۶ و ۵۴/۸۰ درصد در غلظت ۰/۳ درصد صفر) در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش می‌باشند (Ebrahimi et al., 2017). از ویژگی‌های مهم هر باکتری پروبیوتیک، زنده‌مانی آن با جمعیت مناسب در دستگاه گوارش می‌باشد (Chalas et al., 2016). از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در دستگاه گوارش می‌توان به اثر ماتریس غذایی، قابلیت تحمل pH پایین و هیدرولیز نمک‌های صفراوی اشاره نمود. باکتری‌های اسیددوست در pHهای پایین‌تر از محدوده رشدشان ترکیبات اسیدی محیط را به‌وسیله آنزیم‌های دکربوکسیلاز، هیدرولیز کرده و pH محیط را تعدیل می‌کنند (Saarela et al., 2000). اسید هیدرولاز (BSH) و اسید دهیدراتاز صفراوی از جمله آنزیم‌های اساسی میکروبی هستند که با فعالیت هیدرولازی باعث هیدرولیز نمک صفراوی شده و منجر به کاهش سمیت و اثرات جانبی نمک

کردند. باکتری‌های اسیدلاکتیک که در طی تخمیر جو دوسر غالب بودند، متعلق به لاکتوباسیلوس فرمنتوم (*Lactobacillus fermentum*)، لاکتوباسیلوس پارالیمنتاریوس (*Lactobacillus paralimentarius*)، لاکتوباسیلوس هلوتیکوس (*Lactobacillus helveticus*) و لاکتوباسیلوس پونتیس (*Lactobacillus pontis*) بودند (Vogelmann et al., 2009). بنابراین تفاوت در باکتری‌های اسیدلاکتیک غالب نه تنها تحت تأثیر سوبسترا و شرایط تخمیر قرار می‌گیرد، بلکه رقابت در کسب مواد مغذی و همچنین تطابق‌پذیری باکتری غالب با شرایط ایجادشده طی فرایندهای مایه‌گیری در مقایسه با فلور میکروبی طبیعی نیز از اهمیت ویژه‌ای در این زمینه برخوردار است. افزایش تعداد دفعات مایه‌گیری، منجر به انتخاب تعداد بسیار اندکی از فلور میکروبی اصلی بستره تخمیری می‌گردد که جمعیت بیشتری را به خود اختصاص می‌دهند. در ابتدا اکثر میکروارگانیسم‌های موجود در خمیر می‌توانند رشد کنند اما میکروارگانیسم‌هایی که در طی مایه‌گیری خمیرترش باقی می‌مانند قادر به رقابت بیشتر و تطابق‌پذیری بالاتری هستند. تنوع فلور میکروبی بومی دانه غلات و آرد آن‌ها، تحت تأثیر شرایط کشت و نگهداری نیز قرار می‌گیرد (De Vuyst and Neysens, 2005). نوع غله نیز به‌واسطه مقدار و کیفیت کربوهیدرات‌ها به‌عنوان سوبسترای اولیه تخمیر، منابع نیتروژن و عوامل رشد، یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر تخمیر است (Hammes et al., 2005). در آرد، علاوه بر مقدار کربوهیدرات قابل تخمیر، ظرفیت بافری، pH و حضور ترکیبات مهارکننده نیز می‌تواند بر ظرفیت اسیدی شدن و رشد میکروارگانیسم‌ها تأثیر بگذارد (Banu et al., 2011).

باکتریوسین‌ها، اسیدهای آلی، دی‌استیل، اسیدهای چرب، اتانول و پراکسید هیدروژن نیز نسبت داده می‌شود (Kumar Bajaj et al., 2015).

همان‌طور که در قسمت یافته‌ها نیز ذکر شد اثر ضدباکتریایی رومانند فاقد سلول خام جدایه لاکتیکی روی باسیلوس سرئوس و سالمونلا انتریکا بیشتر از رومانند فاقد سلول خنثی شده بود. طی پژوهشی فعالیت ضد میکروبی رومانند فاقد سلول ۹ جدایه لاکتیکی علیه ۴ باکتری غذازاد بررسی شد که از بین آن‌ها ۶ جدایه، اثرات ضد میکروبی قوی علیه هر ۴ باکتری نشان دادند. این جدایه‌ها دارای بیشترین تأثیر روی استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با سایر عوامل بیماری‌زا بودند (Abushelaibi et al., 2017). در پژوهشی دیگر نیز خاصیت ضد میکروبی متابولیت‌های تولیدشده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید که رومانند فاقد سلول پدیدوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی (*Pediococcus acidilactici*) و پدیدوکوکوس پنتازاسئوس روی اشیریشیا کولای، باسیلوس سوبتیلیس و لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*) خاصیت بازدارندگی داشتند (Cizeikiene et al., 2013). با تولید اسیدلاکتیک در طی رشد باکتری‌های پروبیوتیک، اسیدیته محیط به شدت کاهش یافته و باکتری‌های بیماری‌زا به‌طور طبیعی در این شرایط از بین می‌روند (Heller, 2001). در پژوهشی دیگر نیز اثرات ضدباکتریایی رومانند فاقد سلول باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از خمیرترش بر عوامل بیماری‌زای غذازاد از جمله باسیلوس سرئوس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش، بیانگر عدم قدرت بازدارندگی رومانند لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و

صفراوی در پروبیوتیک‌ها می‌گردند. با این حال، مکانیسم مقاومت در برابر pH پایین یا غلظت صفرا می‌تواند بسته به گونه و حتی نژاد باکتری متفاوت باشد (Montville and Matthews, 2013).

در بخشی از نتایج پژوهش حاضر، اثر ضدباکتریایی پدیدوکوکوس پنتازاسئوس علیه باسیلوس سرئوس، سالمونلا انتریکا، استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کولای به‌روش انتشار در دیسک به اثبات رسید. در پژوهشی گزارش شد که یک زیرگونه از لاکتوباسیلوس پلانٹاروم جدا شده با بیش از ۵ میلی‌متر هاله عدم رشد، دارای بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و شیگلا دیسانتری (*Shigella dysenteriae*) بود. همچنین زیرگونه دیگری از همین باکتری، ممانعت‌کنندگی ضعیفی در برابر اشیریشیا کولای داشت و هیچ‌یک از جدایه‌ها نیز دارای فعالیت ضد میکروبی در برابر سودوموناس (*Pseudomonas*) نبودند (Angmo et al., 2016). محققینی دیگر نشان دادند که ویسلا سیباریا (*Weissella cibaria*) دارای تأثیر بازدارندگی روی اشیریشیا کولای و باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) بود (Divya et al., 2012). پروبیوتیک‌ها با مکانیسم‌های متعددی مانند ترشح مواد ضد میکروبی، رقابت برای تصاحب جایگاه اتصال سلول‌های اپی‌تلیال روده، کاهش لانه‌گزینی عوامل بیماری‌زا و ممانعت از ایجاد عفونت می‌توانند از اثر باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کنند (Janković et al., 2012). فعالیت ضدباکتریایی باکتری‌های اسیدلاکتیک به قابلیت آن‌ها در محدود نمودن دسترسی میکروارگانیزم‌های ناخواسته به مواد مغذی و یا تولید ترکیبات بازدارنده نظیر

سویه‌های باکتریایی متفاوت) بررسی می‌گردد. اتصال سویه‌های باکتریایی هم نوع، عموماً موجب اتصال آن‌ها به سلول‌های اپی‌تلیال روده، لانه‌گزینی و محافظت از دستگاه گوارش می‌شود. اتصال سویه‌های باکتریایی متفاوت نیز منجر به واکنش پروبیوتیک‌ها با عوامل بیماری‌زا و همچنین ممانعت از لانه‌گزینی آن‌ها در دستگاه گوارش می‌گردد (Janković *et al.*, 2012). توانایی باکتری‌های اسیدلاکتیک برای اتصال به عوامل بیماری‌زا ممکن است به اجزای سطح سلولی آن‌ها نسبت داده شود، البته این مکانیسم هنوز نیازمند بررسی بیشتر است. تعاملات بین لکتین، کربوهیدرات و اجزای پروتئینی موجود در سطح سلولی نیز ممکن است در این پدیده مؤثر باشند (Tareb *et al.*, 2013).

طی پژوهش حاضر، مشخص گردید که پدیوکوکوس پنتازاسئوس، مقاومت آنتی‌بیوتیکی متفاوتی را در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از خود نشان داد. نتایج بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های لاکتیکی خمیرترش سبوس گندم و سبوس برنج، بیانگر مقاومت لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم (*Lactobacillus paraplantarum*) و پدیوکوکوس پنتازاسئوس در برابر آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید و سپیروفلاکاسین بود. همچنین هر دو جدایه لاکتیکی در برابر آمپی‌سیلین و سفالوتین، حساس بودند (Ehsanbakhsh *et al.*, 2018). نتایج پژوهشگرانی دیگر نیز نشان داد تمام جدایه‌های لاکتیکی نسبت به پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، کلیندامایسین و اریترومایسین، حساس بوده و یا حساسیت نسبی داشتند و سایر جدایه‌ها به ونکومایسین مقاوم بودند (Abushelaibi *et al.*, 2017). جدایه لاکتیکی مورد

لاکتوباسیلوس کورواتوس (*Lactobacillus curvatus*) در برابر باسیلوس سرئوس بود و سایر گونه‌های مورد آزمایش، قدرت بازدارندگی متفاوتی را نشان دادند. در این مطالعه، توزیع ژن‌های موگد باکتریوسین در میان باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از خمیرترش نیز نشان داد که اکثر جدایه‌های لاکتیکی دارای حداقل یک ژن موگد باکتریوسین بودند. بر این اساس، اثرات ضدباکتریایی جدایه‌های مذکور بیشتر به تولید باکتریوسین‌ها نسبت داده شد (Demirbaş *et al.*, 2017). باکتریوسین‌ها در سنتز لیپید II در دیواره سلول باکتری، تداخل ایجاد کرده و باعث ایجاد شکاف در آن می‌شوند. این ترکیبات همچنین مانع از فعالیت آنزیم‌های DNA gyrase، RNA پلیمراز، tRNA سنتتاز شده و به این ترتیب، نقش بازدارندگی خود را ایفا می‌کنند (Şimşek *et al.*, 2006).

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، پدیوکوکوس پنتازاسئوس دارای ۲۷ درصد قابلیت خود اتصالی و ۶۶ درصد قابلیت دگر اتصالی با/شریشیا کولای بود. نتایج حاصل از پژوهش محققینی افزایش خود اتصالی ۹ جدایه لاکتیکی را در حین گرمخانه‌گذاری نشان داد. همچنین دگر اتصالی این جدایه‌های لاکتیکی با/شریشیا کولای، پس از ۲ و ۴ ساعت در دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷ درجه سلسیوس نسبت به ۲۰ درجه سلسیوس افزایش یافت (Abushelaibi *et al.*, 2017). محققینی دیگر با بررسی جدایه‌های لاکتیکی مختلف، دریافتند که لاکتوباسیلوس پلانتاروم بیشترین مقدار قابلیت خود اتصالی را داشت (Angmo *et al.*, 2016). قابلیت اتصال در باکتری‌ها به دو صورت خود اتصالی (اتصال سویه‌های باکتریایی هم نوع) و دگر اتصالی (اتصال

می‌تواند لایه‌های اپی‌تلیال روده را دچار اختلال کند لذا فقدان فعالیت همولیزی در آن‌ها برای مصارف انسانی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (Angmo et al., 2016). جدایه لاکتیکی مورد مطالعه در این پژوهش، دارای اثر ضدقارچی روی *آسپرژیلوس نایجر* بود. بر اساس نتایج پژوهشی *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم* و *لاکتوباسیلوس پارالیمنتاریوس* بالاترین سطوح اثرات مهارری را روی *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم کرایزورنوم* (*Penicillium chrysogenum*) نشان دادند در حالی که *لوکونوستوک سودومزتریئودس* (*Leuconostoc pseudomesenteroides*)، *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس روسائی* (*Lactobacillus rossiae*) فعالیت بازدارنده‌ای را در برابر قارچ‌های مذکور نشان ندادند (Demirbaş et al., 2017). در پژوهشی دیگر اثرات ضدقارچی پپتیدهای ضد میکروبی تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم* در برابر *آسپرژیلوس نایجر* مورد بررسی قرار گرفت. جالب توجه اینکه ترکیبات مذکور از جوانه‌زنی اسپور و همچنین رشد هیف قارچ جلوگیری نمودند هر چند که تأثیر بازدارنده آن‌ها بر جوانه‌زنی اسپور قارچ تا حدی بیشتر بود (Gupta and Srivastava, 2014). از عوامل مؤثر بر خاصیت ضدقارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌توان به تولید اسیدهای آلی نظیر اسیدلاکتیک و اسید استیک اشاره کرد. همچنین دی‌پپتیدهای حلقوی و ترکیبات فعال دیگر مانند ۴-هیدروکسی فنیل پروپانویک اسید، فنیل پروپانویک اسید و فنیل لاکتیک اسید نیز در بروز خواص ضدقارچی آن‌ها مؤثر هستند. اثر پپتیدهای ضد میکروبی نیز بر رشد *میسلیوم* قارچ ممکن است

مطالعه در پژوهش حاضر، نسبت به ونکومایسن، مقاومت نشان داد که دلیل آن را می‌توان به حضور D-D-آلانین به جای D-لاکتات یا D-سرین در لایه‌های پپتیدوگلیگان این باکتری نسبت داد (Kumar Bajaj et al., 2015). یکی از مهم‌ترین ساز و کارهای باکتری‌ها برای مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها وجود پمپ‌هایی است که سبب انتشار آنتی‌بیوتیک به خارج از سلول و در نتیجه کاهش غلظت آن در سلول می‌شود (Savjani et al., 2009). مقاومت در برابر یک آنتی‌بیوتیک مشخص ممکن است ناشی از عدم وجود محل هدف آن آنتی‌بیوتیک در باکتری اسیدلاکتیک مورد مطالعه باشد. هر چند ممکن است باکتری‌ها در طی زمان، صفات مقاومت چندگانه را طی تراریختی طبیعی از طریق ژن-های پلاسمیدی، جهش‌های کروموزومی، انتقال غیر مؤثر آمینوگلیکوزیدها و همچنین اصلاح آنزیمی، به دست آورده و متعاقباً به چندین گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شوند (Lowy, 2003).

جدایه لاکتیکی مورد مطالعه در پژوهش حاضر، فاقد هرگونه فعالیت همولیزی بود. طی پژوهشی نتیجه همولیز خون توسط همه جدایه‌های لاکتیکی، منفی گزارش شد (Angmo et al., 2016). اما در پژوهشی دیگر برخی از جدایه‌های لاکتیکی دارای فعالیت‌های همولیتیک آلفا و بتا بودند (Abushelaibi et al., 2017). به‌طور کلی سه نوع فعالیت همولیزی آلفا، بتا و گاما در باکتری‌ها وجود دارد. مشاهده هاله سبزرنگ در محیط کشت خون‌دار، نشانگر فعالیت همولیزی آلفا و هاله زردرنگ، همولیز نوع بتا را نشان می‌دهد. اما طی همولیز نوع گاما هیچ‌گونه تغییر رنگی در محیط کشت مشاهده نمی‌شود. از آنجاکه فعالیت همولیزی باکتری‌ها

مناسبی بود. علاوه بر این، رومانند فاقد سلول این جدایه نیز از خود، اثرات ضدباکتریایی نشان داد. بنابراین، جدایه پدیوکوکوس پنتازا/سئوس از قابلیت مناسبی برای استفاده به عنوان کشت پروبیوتیک و یا نگه‌دارنده در صنایع تخمیری برخوردار می‌باشد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

به‌واسطه تأثیر آن‌ها روی دیواره سلولی باشد (Magnusson *et al.*, 2003).

در پژوهش حاضر، خصوصیات پروبیوتیکی و ضدقارچی باکتری اسیدلاکتیک غالب جداشده از خمیرترش جو دوسر مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج این پژوهش، جدایه پدیوکوکوس پنتازا/سئوس توانایی زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش را داشت. همچنین جدایه مذکور دارای قابلیت‌های خود اتصالی و دگر اتصالی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک و اثر ضدباکتریایی و همچنین ضدقارچی

منابع

- AACC (2010). Protein 46-10, fat 30-10 and ash 08-01 methods. In. St. Paul, MN, USA: American association of cereal chemists (AACC) international.
- Abnous, K., Brooks, S.P., Kwan, J., Matias, F., Green-Johnson, J., Selinger, L.B., *et al.*, (2009). Diets enriched in oat bran or wheat bran temporally and differentially alter the composition of the fecal community of rats. *The Journal of Nutrition*, 139(11): 2024-2031.
- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N.P. and Ayyash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT-Food Science and Technology*, 79: 316-325.
- Andrabi, S.T., Bhat, B., Gupta, M. and Bajaj, B.K. (2016). Phytase-producing potential and other functional attributes of lactic acid bacteria isolates for prospective probiotic applications. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8(3): 121-129.
- Angmo, K., Kumari, A. and Bhalla, T.C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-Food Science and Technology*, 66: 428-435.
- Banu, I., Vasilean, I. and Aprodu, I. (2011). Effect of select parameters of the sourdough rye fermentation on the activity of some mixed starter cultures. *Food Biotechnology*, 25(4): 275-291.
- Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M.T., López, P. and Spano, G. (2012). Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(6): 1383-1394.
- Chalas, R., Janczarek, M., Bachanek, T., Mazur, E., Cieszko-Buk, M. and Szymanska, J. (2016). Characteristics of oral probiotics—a review. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 29(1): 8-10.
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A. and 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.
- Collado, M.C., Meriluoto, J. and Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226(5): 1065-1073.

- De Vuyst, L. and Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1-3): 43-56.
- Demirbaş, F., İspirli, H., Kurnaz, A.A., Yilmaz, M.T. and Dertli, E. (2017). Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. *LWT-Food Science and Technology*, 79: 361-366.
 - Divya, J.B., Varsha, K.K. and Nampoothiri, K.M. (2012). Newly isolated lactic acid bacteria with probiotic features for potential application in food industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(5): 1314-1324.
 - Ebrahimi, M., Sadeghi, A., Sadeghi, B. (2017). Phylogenetic relationship and probiotic properties of dominant lactic acid bacteria isolated from whole barley sourdough. *Journal of Food Microbiology*, 4: 57-70. [In Persian]
 - Ehsanbakhsh, M., Raeisi, M., Ebrahimi, M., Kashaninejad, M. (2018). Evaluation of antibacterial and probiotic properties of *Lactobacillus paraplantarum* and *Pediococcus* isolated from wheat bran and rice bran sourdoughs. *Journal of Food Microbiology*, 5(1): 9-25. [In Persian]
 - Gupta, R. and Srivastava, S. (2014). Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. *Food Microbiology*, 42: 1-7.
 - Hammes, W.P., Brandt, M.J., Francis, K.L., Rosenheim, J., Seitter, M.F. and Vogelmann, S.A. (2005). Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1-3): 4-11.
 - Heller, K.J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2): 374-379.
 - Hüttner, E.K., Dal Bello, F. and Arendt, E.K. (2010). Identification of lactic acid bacteria isolated from oat sourdoughs and investigation into their potential for the improvement of oat bread quality. *European Food Research and Technology*, 230(6): 849-857.
 - Janković, T., Frece, J., Abram, M. and Gobin, I. (2012). Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Sanitary Engineering Research*, 6: 19-24.
 - Kumar Bajaj, B., Claes, I.J. and Lebeer, S. (2015). Functional mechanisms of probiotics. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4(4): 321-327.
 - Lowy, F.D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(9): 1265-1273.
 - Luana, N., Rossana, C., Curiel, J.A., Kaisa, P., Marco, G. and Rizzello, C.G. (2014). Manufacture and characterization of a yogurt-like beverage made with oat flakes fermented by selected lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 185: 17-26.
 - Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J. and Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219(1): 129-135.
 - Manini, F., Casiraghi, M.C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D. and Plumed-Ferrer, C. (2016). Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT-Food Science and Technology*, 66: 275-283.
 - Montville, T.J. and Matthews, K.R. (2013). Physiology, growth, and inhibition of microbes in foods. In *Food Microbiology: American Society of Microbiology* 3-18.
 - Reller, L.B., Weinstein, M., Jorgensen, J.H. and Ferraro, M.J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11): 1749-1755.
 - Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F. and Torres, C. (2006). Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111(3): 234-240.

-
- Rolim, F.R.L., dos Santos, K.M.O., de Barcelos, S.C., do Egito, A.S., Ribeiro, T.S., da Conceição, M.L., *et al.* (2015). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2): 807-813.
 - Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.M. and Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1): 1-16.
 - Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J. and Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3): 197-215.
 - Sakandar, H.A., Usman, K. and Imran, M. (2018). Isolation and characterization of gluten-degrading *Enterococcus mundtii* and *Wickerhamomyces anomalus*, potential probiotic strains from indigenously fermented sourdough (Khamir). *LWT-Food Science and Technology*, 91: 271-277.
 - Savjani, J.K., Gajjar, A.K. and Savjani, K.T. (2009). Mechanisms of resistance: useful tool to design antibacterial agents for drug-resistant bacteria. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(2): 194-205.
 - Servin, A.L. (2004). Antagonistic activities of *lactobacilli* and *bifidobacteria* against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4): 405-440.
 - Şimşek, Ö., Çon, A.H. and Tulumog˘lu, Ş. (2006). Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. *Food Control*, 17(4): 263-270.
 - Tareb, R., Bernardeau, M., Gueguen, M. and Vernoux, J.P. (2013). *In vitro* characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology*, 62(4): 637-649.
 - Vogelmann, S.A., Seitter, M., Singer, U., Brandt, M.J. and Hertel, C. (2009). Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3): 205-212.
 - Zhang, Y., Zhang, L., Du, M., Yi, H., Guo, C., Tuo, Y., *et al.* (2011). Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiological Research*, 167(1): 27-31.



Evaluation of probiotic and antifungal properties of the predominant LAB isolated from oat sourdough

Hajinia, F.¹, Sadeghi, A.^{2*}, Sadeghi Mahoonak, A.R.³, Khomeiri, M.⁴, Maghsoudlou, Y.⁵, Moayedi, A.⁶

1. M.Sc. Student of Food Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
 2. Associate professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
 3. Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
 4. Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
 5. Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
 6. 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: 2019/12/8 Accepted: 2020/1/28)

Abstract

Evaluation of probiotic and antifungal properties of the lactic acid bacteria (LAB) isolated from different sourdoughs is so important to prepare microbial cultures for fermentation industries. In the present study, a predominant LAB was isolated from oat sourdough through the back-slopping process, and then it was identified using PCR. Subsequently, probiotic properties of the LAB isolate (including resistance to acid and bile, antibacterial effect, auto and co-aggregations capabilities, antibiotic susceptibility and hemolytic activity), as well as its antifungal activity against *Aspergillus niger* were studied. Sequencing results of the PCR products led to the identification of *Pediococcus pentosaceus* as predominant LAB isolated from oat sourdough. The survival rate of the LAB isolates after continuous acid and bile treatment was 59.80% in comparison with the control. The antibacterial effect of the LAB on *Bacillus cereus* was also significantly ($p < 0.05$) higher than the other studied food-borne pathogenic agents. Crude cell-free supernatant (CFS) of the LAB completely inhibited the growth of *B. cereus*, but reduced the growth of *Salmonella enterica* by 65.68%. Meanwhile, naturalized CFS of the LAB had no inhibitory effect on these bacteria. Furthermore, the LAB isolates had a proper co-aggregation with *Escherichia coli*, and showed resistance towards streptomycin, ciprofloxacin, nalidixic acid and vancomycin antibiotics. The LAB isolates had no hemolytic activity, and its antifungal effect on *A. niger* was also approved. Accordingly, *P. pentosaceus* isolate has proper potential to use as probiotic or preservative microbial culture in fermentation industries.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Antifungal effect, Predominant LAB isolates, Probiotic properties, Oat sourdough