شناسایی مولکولی و ارزیابی اثرات ضدمیکروبی جدایه لاکتیکی عمده ترخینه و ترکیبات شبه باکتریوسینی آن در برابر برخی از عوامل میکروبی غذازاد

آتنا سارانی[1]، علیرضا صادقی[2*]، مرتضی خمیری[2]، یحیی مقصودلو[2]، علی مویدی[2]، مریم ابراهیمی[3]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

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

۳. مرکز تحقیقات سلامت فراورده‌های غذایی، دارویی و طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان.

***نویسنده مسئول:** *Sadeghi.gau@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۷

چکیده

جداسازی و ارزیابی ویژگی‌های باکتری‌های اسید لاکتیک از فراورده‌های تخمیری سنتی، همواره احتمال مواجهه با جدایه‌های دارای قابلیت‌های منحصر به فرد را در پی داشته است. در این مطالعه پس از شناسایی مولکولی جدایه لاکتیکی عمده ترخینه، اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی جدایه مذکور و ترکیبات شبه باکتریوسینی آن در برابر برخی از شاخص‌های میکروبی غذازاد بر اساس روش‌های مرجع مورد بررسی قرار گرفت. توالی‌یابی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز منجر به شناسایی *لاکتوکوکوس لاکتیس* به عنوان جدایه لاکتیکی عمده ترخینه شد. جدایه مذکور دارای اثرات ضد باکتریایی مناسبی بود اما تفاوت معنی داری ($P<۰/۰۵$) بین قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* در حضور این جدایه لاکتیکی وجود نداشت. علاوه بر این، اثر بازدارنده روماند خام به ترتیب نسبت به روماند خنثی و روماند عمل‌آوری شده جدایه لاکتیکی بر روی هر یک از شاخص‌های باکتریایی مورد مطالعه بیشتر بود و بیشترین مقدار کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* (۸۷/۹۱ درصد) در حضور روماند خام حاصل از فاز رشد لگاریتمی مشاهده شد. همچنین جدایه لاکتیکی اثر ضد قارچی بیشتری بر *آسپرژیلوس فلاووس* نسبت به *آسپرژیلوس نایجر* داشت ولی میزان رشد *آسپرژیلوس نایجر* در روزهای سوم تا ششم گرمخانه‌گذاری در مقایسه با *آسپرژیلوس فلاووس* در حضور ترکیبات شبه باکتریوسینی جدایه لاکتیکی به شکل معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بیشتر بود. بر اساس نتایج این پژوهش، جدایه *لاکتوکوکوس لاکتیس* و ترکیبات شبه باکتریوسینی آن از قابلیت استفاده به عنوان کشت آغازگر در تولید فراورده‌های تخمیری و یا نگهدارنده زیستی در صنایع غذایی و دارویی برخوردار می‌باشند.

کلید واژه ها: ترخینه، جدایه لاکتیکی، اثر ضد میکروبی، ترکیبات شبه باکتریوسینی.

مقدمه

عموما باکتری‌های اسید لاکتیک، بخش مهمی از فلور میکروبی فراورده‌های تخمیری سنتی را به خود اختصاص می‌دهند و همواره احتمال مواجهه با جدایه-های لاکتیکی دارای قابلیت‌های ضد میکروبی مناسب در این فراورده‌ها وجود دارد. این باکتری‌ها با داشتن خاصیت ضد میکروبی، سبب کاهش رشد و گسترش میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد شده و همچنین سموم و متابولیت‌های تولید شده توسط آن‌ها را بی‌اثر می‌کنند (Caplice and Fitzgerald., 1999).

ترخینه، ماده اولیه در تهیه سوپ سنتی در نواحی کوهستانی غرب ایران است که از تخمیر بلغور گندم در دوغ گوسفند حاصل می‌شود و باکتری‌های اسید لاکتیک نقش اصلی را در تخمیر آن بر عهده دارند (Vasiee et al., 2014). اکثر پژوهش‌های صورت گرفته در خصوص ویژگی‌های ضد میکروبی جدایه‌های لاکتیکی فراورده‌های تخمیری سنتی، حاکی از نقش بارز آن‌ها در ممانعت از فعالیت میکروارگانیسم‌های غذازاد بوده است. به عنوان مثال، اولیورا و همکاران (۲۰۱۵)، باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از یک فراورده تخمیری و پالیده کشت آن‌ها را مورد مطالعه

www.SID.ir

Archive of SID

قرار داده و اثر ضد قارچی مناسب آن‌ها را برای استفاده در طیف گسترده‌ای از تولیدات غذایی تایید نمودند (Oliveira et al., 2015). سیزیکین و همکاران (۲۰۱۳)، تاثیر ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک را در مواد غذایی و نان، در برابر قارچ‌های *فوزاریوم، پنیسیلوم، آسپرژیلوس، دباریومایسس* و *کاندیدا* مورد مطالعه قرار دادند (Cizeikiene et al., 2013). کرستی و همکاران (۲۰۰۸)، نیز قابلیت تولید باکتریوسین در باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از خمیرترش را مورد مطالعه قرار داده‌اند (Corsetti et al., 2008). تودورو و همکاران (۲۰۰۸) نیز ضمن بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از بوزا (نوشیدنی تخمیری مبتنی بر غلات) خصوصیات ضد باکتریایی آن‌ها را تایید نمودند (Todorov et al., 2008).

باکتری‌های اسید لاکتیک از قابلیت تولید ترکیبات ضد میکروبی نظیر اسیدهای آلی، دی استیل، استون، پراکسید هیدرژن، پپتیدهای ضد قارچی، باکتریوسین‌ها و ترکیبات شبه باکتریوسینی برخوردارند که در مقابل طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا و مولد فساد موثر می‌باشند (Galvez et al., 2007). ترکیبات شبه باکتریوسینی، مخلوط پیچیده‌ای از متابولیت‌های ضد میکروبی پروتئینی هستند که دارای وزن مولکولی، ساختار، طیف و نحوه اثر متفاوتی بر روی باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشند (Sharma et al., 2014). تاج‌آبادی ابراهیمی و همکاران (۱۳۸۹) با مطالعه بر روی ترخینه، ۲۶ سویه از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* را جداسازی کرده و قابلیت کاهش کلسترول و توانایی زنده‌مانی آن‌ها را در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش بررسی نمودند. در مطالعه دیگری با بررسی ۹ نمونه ترخینه مختلف، ۵۴ باکتری اسید لاکتیک جداسازی شد و خصوصیات پروبیوتیکی آن‌ها بررسی گردید که بیشترین جمعیت و بیشترین قابلیت پروبیوتیکی از بین جدایه‌های مذکور به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تعلق گرفت (Vasiee et al.,2014). طباطبایی‌یزدی و همکاران (۱۳۹۵) نیز ۱۰ باکتری اسید لاکتیک را از سومین روز تخمیر ترخینه جداسازی و تغییرات فلور میکروبی ترخینه را در طی تخمیر بررسی نمودند. بر اساس یافته‌های این محققین، جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک طی ۲۴ ساعت اول تخمیر ترخینه، افزایش و با گذشت زمان گرماخانه‌گذاری کاهش یافت ولی تغییر جمعیت مخمرها در این زمان از روند مشابهی تبعیت نکرد.

هدف از این مطالعه، بررسی خاصیت ضد میکروبی جدایه لاکتیکی عمده ترخینه و ترکیبات شبه باکتریوسینی آن در برابر برخی از عوامل باکتریای و قارچی غذازاد بود. شایان ذکر است که تاکنون، مطالعات بسیار محدودی در خصوص فلور میکروبی ترخینه صورت گرفته است. ضمن اینکه به دلیل تفاوت این اکوسیستم تخمیری به لحاظ فرمولاسیون یا نحوه فرآوری، امکان مواجهه با فلور میکروبی منحصر به فرد در آن نامحتمل نیست.

روش کار

این مطالعـــه تجربی در سال ۱۳۹۶ و در آزمایشـگاه‌های دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در دو بخش به اجرا درآمد. در بخش نخست، پس از تهیه ترخینه، باکتری اسید لاکتیک عمده آن، جداسازی و با توالی‌یابی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شناسایی شد. در بخش دوم، ویژگی‌های ضد میکروبی جدایه مذکور و همچنین ترکیبات شبه باکتریوسینی آن در برابر برخی از شاخص‌های میکروبی غذازاد مورد بررسی قرار گرفت.

تامین مواد اولیه و ارزیابی ویژگی‌های آن‌ها

پس از تهیه بلغور گندم (مخلوطی از چند واریته) و دوغ گوسفندی برخی از ویژگی‌های آن‌ها نظیر رطوبت، پروتئین، گلوتن و خاکستر بر اساس روش‌های مدوّن تعیین گردید (AACC, 2010; AOAC, 2003). محیط‌های کشت مصرفی و مواد شیمیایی مورد

www.SID.ir

استفاده در این پژوهش نیز از شرکت مرک آلمان تهیه گردید.

تهیه ترخینه

برای تولید ترخینه پس از مخلوط نمودن بلغور گندم با دوغ گوسفندی استریل (متناسب با جذب آرد)، مخلوط تولیدی به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط تخمیر شد (Vasiee et al., 2014).

تهیه عوامل میکروبی غذازاد و فعال‌سازی آن‌ها

سویه‌های میکروبی شامل *اشریشیا کلی* (*Esherichia coli* PTCC 1399)، *استافیلوکوکس اورئوس* (*Staphylococcus aureus* PTCC 1112)، *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus* PTCC 5006) و *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger* PTCC 5012) از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران خریداری شده و سپس در محیط‌های کشت اختصاصی، فعال‌سازی گردیدند.

جداسازی و شناسایی مولکولی جدایه لاکتیکی عمده ترخینه

باکتری اسید لاکتیک عمده ترخینه، با تهیه رقت‌های متوالی و کشت سطحی ترخینه تولیدی در محیط کشت اختصاصی mMRS جدا شدند. جدایه‌های لاکتیکی پس از خالص‌سازی پرگنه، با آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم و کاتالاز نیز مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه، جدایه‌های مذکور به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز دارای پرایمرهای اختصاصی و توالی‌یابی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شناسایی - گردیدند. پرایمر مورد استفاده و شرایط واکنش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، مطابق روش آبنوس و همکاران (۲۰۰۹) اعمال شد (Abnous et al., 2009). توالی هدف تکثیر بخشی از ژن *16S rDNA* با طول ۱۵۰۰ جفت باز بود که طی ۳۰ چرخه حرارتی شامل واسرشت (۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه)، اتصال پرایمر (۵۴ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه) و توسعه محصول (۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۶۰ ثانیه) در ترموسایکلر (کوربت، استرالیا) تکثیر شد.

ارزیابی اثر ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی به روش لکه-گذاری

برای ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی در مقابل *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکس اورئوس* از شیوه لکه‌گذاری استفاده شد. بدین منظور پس از لکه گذاری ۲۰ میکرولیتر از جدایه لاکتیکی (کشت ۲۴ ساعته) بر روی محیط کشت MRS آگار و گرمخانه‌گذاری آن به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس، محیط کشت BHI آگار (۰/۸ درصد) حاوی جمعیت 10^6 CFU/mL از هر شاخص باکتریایی بر روی کشت قبلی افزوده شد و پس از جامد شدن لایه دوم، پلیت مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرمخانه‌گذاری گردید (Jorgensen and Turnidge., 2015).

ارزیابی اثر ضد قارچی جدایه لاکتیکی به روش کشت دو لایه

برای بررسی اثر ضد قارچی جدایه لاکتیکی ترخینه از روش کشت دو لایه استفاده گردید (Magnusson and Schnurer., 2001). ابتدا با سوآب استریل از کشت فعال جدایه لاکتیکی خطوطی به طول ۳ سانتی-متر با فاصله متناسب از یکدیگر در مرکز پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS آگار کشیده شد و سپس به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. برای تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ‌های شاخص نیز پلیت‌های کشت داده شده آن‌ها در محیط YGC آگار به مدت ۷ روز در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از گرمخانه‌گذاری، اسپورها با استفاده از آب مقطر استریل، شسته و جمع‌آوری گردیدند. شمارش اسپورها نیز با استفاده از لام هموسیتومتر انجام شد و اسپورها تا 10^5 CFU/mL رقیق گردیدند. سپس مخلوط حاوی یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور با ۹ میلی‌لیتر از محیط کشت YGC آگار بر روی خطوط کشت داده

www.SID.ir

Archive of SID

شده جدایه لاکتیکی ریخته شد (کشت دو لایه) و پس از انعقاد لایه دوم، پلیت‌ها در دمای ۲۶ درجه سلیسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند. سپس قطر هاله عدم رشد قارچ در اطراف خطوط کشت داده شده جدایه لاکتیکی تعیین شد.

تعیین فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه لاکتیکی

بدین منظور پس از کشت جدایه لاکتیکی در محیط کشت MRS براث در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس، با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (پی‌جی‌اینسترومنتز، انگلستان) در فواصل زمانی مشخص، منحنی رشد ترسیم گردید (Gulahmadov et al., 2009).

تهیه ترکیبات شبه باکتریوسینی از فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه لاکتیکی

برای تهیه پالیده خام جدایه لاکتیکی، کشت حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون آن با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، دمای ۴ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ (هانیل‌کمبی ۵۱۴ آر، کره جنوبی) شد. سپس مایع رویی به دست آمده از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرون (جت بوفیل، چین) عبور داده شد. در ادامه برای تهیه پالیده خنثی، pH پالیده خام با اسید کلریدریک یک نرمال به ۶/۵ رسانده شد. نهایتا برای تهیه ترکیبات شبه باکتریوسینی (پالیده عمل‌آوری شده) از تیمار یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر کاتالاز (سیگما، آمریکا) بر روی پالیده خنثی استفاده گردید (Wang et al., 2012).

تعیین اثر ضد باکتریایی ترکیبات شبه باکتریوسینی جدایه لاکتیکی برعلیه *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

خاصیت ضدباکتریایی ترکیبات شبه باکتریوسینی جدایه لاکتیکی به روش میکرودایلوشن مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور شاخص‌های باکتریایی در محیط کشت نوترینت براث کشت داده شده و جمعیت آن‌ها 10^8 CFU/mL رسانده شد. سپس به هر چاهک میکروپلیت، حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر اضافه شد. نمونه کنترل منفی حاوی پالیده خام و شاخص‌های باکتریایی اتوکلاو شده، کنترل مثبت حاوی محیط کشت MRS براث و شاخص‌های باکتریایی و سایر نمونه‌ها نیز حاوی پالیده‌های خام، خنثی و یا عمل‌آوری شده به همراه شاخص‌های باکتریایی بودند. در نهایت، میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرمخانه‌گذاری شد و توسط دستگاه خوانشگر الایزا (سدکو، روسیه) در طول موج ۶۲۰ نانومتر جذب‌سنجی صورت گرفت (Lavermicocca et al., 2003).

تعیین اثر ضد قارچی ترکیبات شبه باکتریوسینی جدایه لاکتیکی بر علیه *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر*

برای ارزیابی خاصیت ضد قارچی ترکیبات شبه باکتریوسینی جدایه لاکتیکی ابتدا در هر پلیت، مخلوطی از هر یک از ترکیبات شبه باکتریوسینی جدایه لاکتیکی و YGC ریخته شد. از محیط کشت YGC آگار بدون ترکیبات شبه باکتریوسینی نیز به عنوان نمونه کنترل استفاده گردید. سپس مرکز هر پلیت با ۳ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور هریک از قارچ‌ها با 10^6 CFU/mL لکه‌گذاری گردید. پلیت‌ها تا زمانی که قارچ، تمام سطح پلیت کنترل را پوشاند در دمای ۲۶ درجه سلیسیوس گرمخانه‌گذاری شده و رشد کپک‌ها با تعیین قطر کلنی آن‌ها به صورت روزانه بررسی گردید (Wang et al., 2012).

آنالیز آماری

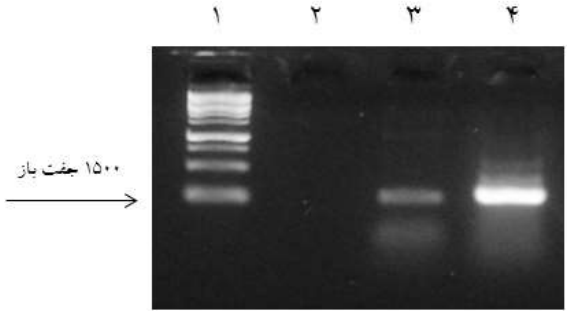
نتایج حاصل از این پژوهش بر اساس طرح کاملا تصادفی در سه تکرار و با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح ۹۵ درصد انجام شد.

www.SID.ir

نتایج

شناسایی مولکولی جدایه لاکتیکی

بلغور گندم مورد استفاده در پژوهش حاضر برای تهیه ترخینه دارای ۱۲/۲۵ درصد پروتئین، ۱/۳۷ درصد چربی و ۱۷/۸۰ درصد فیبر خوراکی بود. دوغ گوسفندی نیز ۴/۹۲ درصد پروتئین، ۵/۷۶ درصد چربی و ۱۰/۶۴ درصد مواد جامد بدون چربی داشت. از بین جدایه‌های لاکتیکی ترخینه، یک باکتری گرم مثبت، کاتالاز منفی و کروی شکل، دارای بیشترین جمعیت بود که برای ارزیابی‌های بعدی به عنوان جدایه لاکتیکی عمده ترخینه انتخاب گردید. همانطور که در شکل۱ نیز مشاهده می‌شود تکثیر توالی هدف ۱۵۰۰ جفت بازی در جدایه لاکتیکی عمده ترخینه مورد تایید قرار گرفت. همچنین نتایج توالی‌یابی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز پس از مقایسه توالی مذکور با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی (NCBI (National Center for Biotechnology Information) با استفاده از رویه (Basic Local Alignment Search Tool) BLASTn منجر به شناسایی *لاکتوکوکوس لاکتیس* (با شماره دسترسی NR-113925 در بانک جهانی ژن) به عنوان جدایه لاکتیکی عمده ترخینه شد.

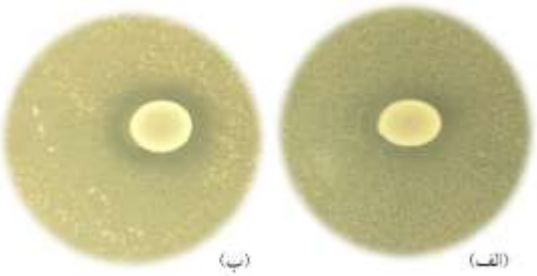


شکل۱: ژل الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با توالی هدف ۱۵۰۰ جفت باز برای شناسایی جدایه لاکتیکی عمده ترخینه. لاین۱: مارکر DNA، لاین۲: کنترل منفی یا فاقد DNA، لاین۳: تکثیر DNA جدایه لاکتیکی و لاین۴: کنترل مثبت یا حاوی DNA باکتری اسید لاکتیک کلکسیونی.

ارزیابی اثر ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی و ترکیبات شبه باکتریوسینی آن

اثر ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی

اثر بازدارنده جدایه *لاکتوکوکوس لاکتیس* بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* در شکل۲ نشان داده شده است. آنالیز آماری نتایج نیز نشان داد که جدایه لاکتیکی دارای اثرات ضد باکتریایی بود اما تفاوت معنی داری ($P<۰/۰۵$) بین قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۰/۰±۰۶/۶) و قطر هاله عدم رشد *اشریشیا کلی* (۹/۰±۴۴/۱۶) در حضور جدایه مذکور وجود نداشت.



شکل۲: اثر بازدارنده جدایه لاکتیکی بر روی *اشریشیا کلی* (الف) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ب) به روش لکه‌گذاری.

اثر ضد باکتریایی ترکیبات شبه باکتریوسینی

نتایج حاصل از مطالعه اثر ضد باکتریایی ترکیبات شبه باکتریوسینی جدایه *لاکتوکوکوس لاکتیس* بر روی عوامل میکروبی غذازاد در جدول ۱ ارائه شده است. همانطور که در این جدول آمده است، تفاوت معنی-داری ($P<۰/۰۵$) بین اثر روماند خام حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه لاکتیکی ترخینه بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* مشاهده نشد اما روماندهای خنثی و عمل‌آوری شده (ترکیبات شبه باکتریوسینی) حاصل از فاز رشد لگاریتمی نسبت به روماندهای خنثی و عمل‌آوری شده حاصل از فاز سکون، اثر بازدارندگی بیشتری ($P<۰/۰۵$) بر شاخص-های باکتریایی داشتند. علاوه بر این، از بین روماندهای مذکور فقط اثر روماند خنثی حاصل از فاز رشد لگاریتمی دارای اثر معنی‌دار بیشتری بر روی

www.SID.ir

Archive of SID

استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به *اشریشیا کلی* بود و اثر سایر روماندها بر روی دو شاخص مذکور، تفاوت معنی‌داری نداشت. همچنین اثر بازدارندگی روماند خام به ترتیب نسبت به روماند خنثی و روماند عمل‌آوری شده بر روی هر یک از شاخص‌های باکتریایی مورد مطالعه بیشتر بود و بیشترین مقدار کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* (۸۷/۹۱ درصد) مربوط به روماند خام حاصل از فاز رشد لگاریتمی بود.

جدول۱: درصد کاهش جمعیت (CFU/mL) شاخص‌های باکتریایی در حضور روماندهای خام، خنثی و عمل‌آوری شده (ترکیبات شبه باکتریوسینی) حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون *لاکتوکوکوس لاکتیس* جدا شده از ترخینه

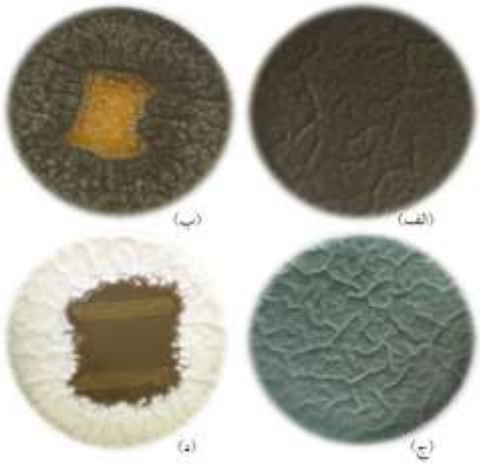
فاز رشد / شاخص میکروبی	روماند خام		روماند خنثی		روماند عمل‌آوری شده	
	لگاریتمی	سکون	لگاریتمی	سکون	لگاریتمی	سکون
استافیلوکوکوس اورئوس	۸۷/۹۱±۰/۵۷^{Aa}	۸۴/۱۹±۲/۰۴^{Aa}	۸۰/۳۹±۰/۷۱^{Aa}	۰±۰^{Ca}	۴۷/۸۴±۸/۵۲Ba	۰±۰Ca
اشریشیا کلی	۸۶/۲۴±۰/۹^{Aa}	۸۶/۱۱±۰/۴۷^{Aa}	۷۰/۸۲±۲/۴۸^{Bb}	۰±۰^{Da}	۵۴/۷۴±۸/۳۷Ca	۰±۰Da

حروف کوچک متفاوت در هر ستون و حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف، مبین تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۹۵ می‌باشد.

ارزیابی اثر ضد قارچی جدایه لاکتیکی و ترکیبات شبه باکتریوسینی آن

اثر ضد قارچی جدایه لاکتیکی

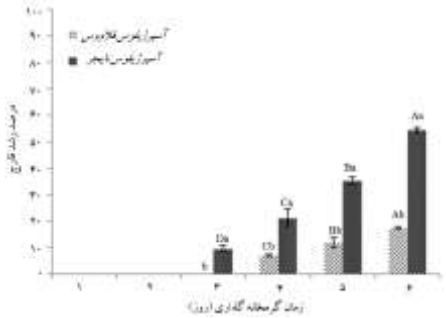
همانطور که در شکل۳ مشاهده می‌شود، اثر ضد قارچی جدایه لاکتیکی بر *آسپرژیلوس فلاووس* نسبت به *آسپرژیلوس نایجر* بیشتر بود.



شکل۳: اثر ضدقارچی جدایه لاکتیکی در برابر آسپرژیلوس نایجر (ب) و آسپرژیلوس فلاووس (د) در مقایسه با نمونه‌های شاهد (الف) و (ج) به روش کشت دو لایه.

اثر ضد قارچی ترکیبات شبه باکتریوسینی

همانطور که در شکل ۴ آمده است میزان رشد *آسپرژیلوس نایجر* در هر یک از روزهای سوم تا ششم گرمخانه‌گذاری در مقایسه با *آسپرژیلوس فلاووس* در حضور ترکیبات شبه باکتریوسینی جدایه لاکتیکی به شکل معنی‌داری ($P<0/05$) بیشتر بود. علاوه بر این، میزان رشد *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* طی روزهای سوم تا ششم گرمخانه‌گذاری به شکل معنی‌داری متفاوت بود.



شکل۴: درصد رشد قارچ‌های شاخص در حضور ترکیبات شبه باکتریوسینی جدایه لاکتیکی در طی زمان گرمخانه‌گذاری. حروف کوچک ناهمسان، اختلاف ($P<0/05$) بین میزان رشد دو قارچ در هر روز را نشان می‌دهد و حروف بزرگ ناهمسان، اختلاف بین رشد هر قارچ را به صورت جداگانه در طی شش روز گرمخانه‌گذاری نشان می‌دهد.

www.SID.ir

بحث

بر اساس نتایج این پژوهش، توالی‌یابی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، منجر به شناسایی *لاکتوکوس لاکتیس* به عنوان جدایه لاکتیکی عمده ترخینه شد. جدایه لاکتیکی مذکور و ترکیبات شبه باکتریوسینی آن نیز دارای اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی مناسبی بر روی شاخص‌های میکروبی غذازاد مورد مطالعه بودند.

تفاوت سوبسترا و شرایط تخمیر از مهم‌ترین عوامل موثر بر تنوع میکروبی فراورده‌های غذایی تخمیری محسوب می‌شوند. با توجه به اینکه ترخیه از تخمیر بلغور گندم و دوغ گوسفند حاصل می‌گردد لذا به واسطه تفاوت در انواع گندم و دوغ گوسفندی و همچنین محتوای آن‌ها و با در نظر گرفتن شرایط متفاوت تخمیر به لحاظ دما و زمان، احتمال مواجهه با جدایه‌های لاکتیکی عمده متفاوت در انواع ترخینه وجود دارد. همه ۵۴ سویه جدا شده از ترخینه در مطالعه وسیعی و همکاران (۲۰۱۴)، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شناسایی شدند (Vasiee et al., 2014). همچنین نافذی و همکاران (۲۰۱۵)، *لاکتوباسیلوس کازئی* را از ترخینه جدا نمودند (Nafezi et al., 2015).

در مطالعه سیزیکین و همکاران (۲۰۱۳)، اثرات ضد میکروبی متفاوتی از جدایه‌های لاکتیکی در برابر میکروارگانیسم‌های غذازاد گزارش گردید. در مطالعه مذکور، بیشترین اثر ضد باکتریایی جدایه‌های لاکتیکی بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* مشاهده شد. همچنین ترکیبات شبه باکتریوسینی *لاکتوباسیلوس سیکی* بیشترین اثر را از بین باکتری‌های غذازاد گرم مثبت، بر روی *باسیلوس سوبتیلوس* نشان داد. این ترکیبات از بین باکتری‌های گرم منفی مورد مطالعه نیز فقط بر روی *سودوموناس* موثر بودند و بر روی سایر باکتری‌های غذازاد گرم منفی اثر بازدارنده‌ای از خود نشان ندادند. این محققین همچنین با توجه به ماهیت پروتئینی ترکیبات شبه باکتریوسینی از تیمارهای پروتئیناز، تریپسین، پپسین و کیموتریپسین در عمل‌آوری روماند خنثی شده باکتری‌های اسید لاکتیک استفاده نموده و لذا حفظ اثر ضد باکتریایی روماند عمل آوری شده را به حضور ترکیبات شبه باکتریوسینی نسبت دادند (Cizeikiene et al., 2013). در مطالعه طباطبایی-یزدی و همکاران (۱۳۹۵) بر روی اثر بازدارندگی پالیده کشت باکتری‌های اسید لاکتیک در pHهای مختلف نیز بیشترین اثر ضد باکتریایی پالیده در pH اسیدی مشاهده شد و اثر آن در pH خنثی کاهش یافت که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (طباطبایی یزدی و همکاران، ۱۳۹۵). تارماراج و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه خود، اثر بازدارندگی پالیده باکتری‌های اسید لاکتیک را به مشتق‌های اسیدی و باکتریوسین‌هایی نسبت دادند که با خنثی‌سازی پالیده، اثر آن‌ها کاهش یافت (Tharmaraj et al., 2009). تفنگ‌سازان و همکاران (۱۳۹۴) نیز اثر بازدارندگی پالیده جدایه لاکتیکی پنیر سنتی را به صورت خام و خنثی شده مقایسه نموده و دلیل کاهش اثر بازدارندگی پالیده خنثی شده را مشتق‌های اسیدی و باکتریوسین‌هایی اعلام کردند که بیشترین فعالیت خود را در pH اسیدی داشتند.

باتسولاس و همکاران (۲۰۱۸) با مطالعه بر روی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از یک منبع تخمیری، خواص پروبیوتیکی و ضد باکتریایی آن را بررسی کردند. در این پژوهش، روماند فاقد سلول (Cell free supernatant) باکتری مذکور، اثر مهارکننده رشد بر روی باکتری‌های هم‌خانواده نظیر *انتروکوکوس اسپرانژیوم* و *لاکتوباسیلوس سیکی* داشت. علاوه بر این، روماند مذکور در برابر باکتری‌های بیماری‌زا و عوامل فساد مواد غذایی شامل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارای اثر بازدارنده بود که علت این اثر را تولید ترکیبات ضد باکتریایی نظیر اسید لاکتیک، اسید استیک، دی‌استیل، پراکسید هیدرژن، باکتریوسین یا

www.SID.ir

Archive of SID

ترکیبات شبه باکتریوسینی نسبت دادند. پس از حذف اسیدهای آلی و پراکسید هیدرژن، تغییری در اثر مهارکنندگی رشد باکتری‌های هم‌خانواده مشاهده نشد. بر این اساس، علت بازدارندگی باکتری مذکور، ترکیبات شبه‌باکتریوسینی آن عنوان شد (Botthoulath et al., 2018). غیر فعال کردن ترکیبات شبه‌باکتریوسینی با آنزیم‌های پروتئولیتیک در مطالعه اسلیم و همکاران (۲۰۰۵)، منجر به شناسایی یک ترکیب شبه-باکتریوسینی جدید با اثر مهارکنندگی در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* شد (Aslim et al., 2005). عمدتا مکانیسم‌های ضد *لیستریایی* باکتری‌های اسید لاکتیک به ترکیبات شبه‌باکتریوسینی آنها نسبت داده می‌شود. باربوسا و همکاران (۲۰۱۴) نیز ترکیبات شبه-باکتریوسینی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* را برای کاربرد در تولید فراورده‌های تخمیری با هدف کنترل رشد *لیستریا* پیشنهاد نمودند. با این حال، اثر مهارکنندگی ترکیبات شبه‌باکتریوسینی در برابر باکتری‌های گرم منفی مشاهده نشد چرا که باکتری‌های گرم منفی دارای غشاء خارجی هستند که مانع نفوذپذیری باکتریوسین می-شود (Barbosa et al., 2014). مالدونادو و همکاران (۲۰۰۳)، اثر مشابهی در مورد پلانتاریسین ان‌سی گزارش کرده‌اند که توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تولید می‌شود. بر اساس پژوهش این محققین نیز پلانتاریسین ان‌سی دارای اثر مهارکنندگی بر روی باکتری‌های گرم مثبت بود. در مقابل، پلانتاریسین ام-جی در برابر هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثر مهارکنندگی رشد از خود نشان داد (Maldonado et al., 2003). دلیل بروز اثرات متفاوت باکتریوسین‌ها به تفاوت انواع تولید شده آن‌ها نسبت داده شده است. همچنین عموما با خنثی‌سازی pH اثر ضد باکتریایی ترکیبات شبه باکتریوسینی این باکتری‌ها کاهش می‌یابد که دلیل آن، حذف اسیدهای آلی و یا اثرات متقابل اسیدهای آلی با سایر متابولیت-های ضد باکتریایی عنوان شده است (Powell et al., 2007).

عباس‌زاده و همکاران (۲۰۱۵) با مطالعه اثر ضد قارچی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در برابر *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* دریافتند که جدایه *لاکتوباسیلوس کازئی* دارای بیشترین اثر ضد قارچی و جدایه *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* دارای کمترین اثر بازدارنده بودند. همچنین بیشترین اثر بازدارندگی این جدایه‌ها از بین کپک‌های مذکور در برابر *آسپرژیلوس فلاووس* مشاهده شد (Abbaszadeh et al., 2015). گول و همکاران (۲۰۰۵) نیز چند باکتری اسید لاکتیک را از سیلوهای گندم جداسازی نموده و ضمن بررسی اثر آن‌ها بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* دریافتند که پالیده این باکتری‌ها در از بین بردن اسپور کپک مذکور، تاثیری نداشته ولی از رشد آن جلوگیری نمودند (Gul et al., 2005).

جودکین و همکاران (۲۰۱۸) با مطالعه بر روی پالیده خام و خنثی شده باکتری‌های اسید لاکتیک در مقابل دوازده کپک متداول، طیف اثر فعالیت ضد قارچی آن‌ها را بررسی نمودند. در این پژوهش، پالیده خام و خنثی شده همه باکتری‌های مورد مطالعه، اثر قارچ کشی بسیار مناسبی در برابر رشد میسلیوم و اسپورزایی *فوزاریوم کولموریوم* نشان دادند. پالیده‌های *لاکتوباسیلوس سیکی*، *پدیوکوکوس اسیدولاکتیس* و *پنتازاسئوس* در برابر *فوزاریوم پوآ* فعالیت ضد قارچی داشتند و پالیده *پدیوکوکوس اسیدولاکتیس*، فعالیت ضد قارچی بر علیه *فوزاریوم سولانی* نشان داد. همچنین پالیده این باکتری‌ها فاقد اثر بازدارندگی بر روی *پنیسیلیوم اکسپانسوم*، *آسپرژیلوس ورسیکالر*، *پنیسیلیوم کریزوژنوم*، *فوزاریوم اوناسئوم* و *سولانی* بودند. بر اساس نتایج این محققین، اسیدهای آلی می-توانند به راحتی به غشای بیرونی کپک‌ها نفوذ کرده و

www.SID.ir

نقش زیادی در اثر ضد قارچی جدایه‌های لاکتیکی ایفا نمایند (Juodeikiene et al., 2018).

گویماریس و همکاران (۲۰۱۸) با مطالعه بر روی اثر بازدارندگی پالیده کشت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* دریافتند که پالیده مذکور، تولید آفلاتوکسین را تا ۹۱ درصد کاهش داد. این محققین همچنین تاثیر شرایط مختلف شامل حرارت اتوکلاو، تیمار با آنزیم و خنثی-سازی pH را بر اثر بازدارندگی پالیده کشت این باکتری بررسی نموده و نشان دادند که بعد از تیمار با حرارت و آنزیم، تعداد کلنی‌های قارچ تا ۳۰ درصد و تولید افلاتوکسین تا ۹۰ درصد کاهش یافت اما پس از خنثی کردن pH، خواص ضد قارچی به ۰ درصد و خواص ضد آفلاتوکسینی به ۱۳ درصد رسید. دلیل تاثیر بازدارندگی پالیده مذکور به تولید اسیدهای آلی مانند اسید استیک و اسید لاکتیک نسبت داده شد. اسیدهای آلی با متلاشی کردن غشاء، کاهش pH درون سلولی و متوقف کردن فعالیت‌های متابولیکی، اثرات بازدارندگی خود را اعمال می‌کنند (Guimarães et al., 2018).

تروبچوا و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی اثر ضد قارچی *لاکتوباسیلوس برویس*، علت بازدارندگی را وجود پراکسید هیدرژن، اسیدهای آلی، پپتیدهای ضد قارچ و دی‌استیل بیان کردند (Tropcheva et al., 2014). اثر ضد قارچی پراکسید هیدرژن بر اسپورزایی *فوزاریوم گرامیناروم* در مطالعه پونتس و همکاران (۲۰۰۶) نیز تایید شده است (Ponts et al., 2006). البته نتایج متناقضی در مورد اثر ضد قارچی پراکسید هیدروژن وجود دارد. به عنوان مثال، گزارش شده است که *بوتریتیس سینرا* می‌تواند این ترکیب را از بین برده و یا اثر قارچ‌کشی آن را به فعالیت بازدارندگی رشد قارچ تقلیل دهد (Gild et al., 1999). تفاوت در میزان اثر ضد قارچی جدایه‌های لاکتیکی به نوع جدایه، متابولیت‌های مختلف تولیدی، نوع قارچ، شرایط گرمخانه‌گذاری نسبت داده شده است (Magnusson et al., 2003).

در مطالعه گویماریس و همکاران (۲۰۱۸)، تاثیر تیمار-های حرارتی و آنزیمی پالیده بر کاهش رشد قارچ در مقایسه با پالیده خام، تفاوت معنی‌داری ($P<0/05$) نداشت. اما پالیده خنثی (pH=۷) نه تنها از اثر ضد قارچی کمتری برخوردار بود که حتی باعث افزایش جزئی رشد قارچ در مقایسه با نمونه کنترل شد. مطالعه اثر ضد آفلاتوکسینی پالیده، تحت تیمارهای مذکور نیز نشان داد که اگر چه تمامی تیمارها در مقایسه با نمونه کنترل به شکل معنی‌داری سبب کاهش آفلاتوکسین شدند اما بین اثر ضدتوکسینی پالیده خام با پالیده تیمار شده حرارتی، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین تیمار آنزیمی و خنثی‌سازی pH نیز به ترتیب به شکل معنی‌داری از اثرات ضد توکسینی کمتری برخوردار بودند اما بین اثر ضدتوکسینی پالیده تیمار شده حرارتی با پالیده خنثی، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (Guimarães et al., 2018).

نتیجه‌گیری

توالی‌یابی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز منجر به شناسایی *لاکتوکوس لاکتیس* به عنوان جدایه لاکتیکی عمده ترخینه شد. جدایه لاکتیکی مذکور و ترکیبات شبه باکتریوسینی آن نیز دارای اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی مناسبی بر روی برخی از شاخص‌های میکروبی غذازاد بودند. امروزه نیاز به جایگزین‌های طبیعی برای آنتی‌بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های سنتزی ضروری‌تر به نظر می‌رسد. لذا استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های آن‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان از جدایه *لاکتوکوکوس لاکتیس* به عنوان کشت آغازگر یا کشت همراه در فرآوری مواد غذایی تخمیری و یا از ترکیبات شبه باکتریوسینی حاصل از کشت این جدایه به واسطه برخورداری از قابلیت‌های ضد میکروبی به عنوان نگهدارنده زیستی استفاده نمود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱. تاج‌آبادی ابراهیمی، مریم.، بهرامی، هدی و زیاری، زهرا. (۱۳۸۴). ترخینه منبع باکتری‌های اسید لاکتیک پروبیوتیک. فصلنامه علوم زیستی، دوره ۴، شماره ۱، صفحه ۸-۱.

۲. تفنگ‌سازان، فرشته.، شهیدی، فخری.، مرتضوی، سیدعلی.، میلانی، الناز و اسحاقی، زرین. (۱۳۹۴). ارزیابی فعالیت ضد باکتری باکتری های اسیدلاکتیک جداشده از پنیر سنّتی کردی در مقایسه با سویه‌های تجاری. میکروب‌شناسی پزشکی ایران، دوره ۷، شماره ۳، صفحه ۴۱-۳۴.

۳. طباطبایی یزدی، فریده.، وسیعی، علیرضا.، علیزاده بهبهانی، بهروز.، مرتضوی، سیدعلی و طباطبایی یزدی، فروزان. (۱۳۹۵). بررسی تنوع جمعیتی باکتری‌های اسید لاکتیک آش کارده با استفاده از روش تکثیر ژن ۱۶S rRNA و تعیین فعالیت ضد میکروبی ترکیبات شبه باکتریوسینی، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، دوره ۱۳، شماره ۵۳، صفحه ۱۴-۱.

4. AACC International. 2010. Approved methods of the American association of cereal chemists. 11th Ed. The St. Paul.

5.Abbaszadeh, S., Tavakoli, R., Sharifzadeh, A., Shokri, H. 2015. Lactic acid bacteria as functional probiotic isolates for inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* and *Penicillium chrysogenum*. J Mycol Méd. 25: 263-267.

6. Abnous, K., Brooks, S.P.J., Kwan, J., Matias, F., Johnson, J.G., Selinger, L.B., Thomas, M., Kalmokoff, M. 2009. Diets enriched in oat bran or wheat bran temporally and differentially alter the composition of the fecal community of rats. J Nutr. 139: 2024-2031.

7. AOAC Method. 2003. In official methods of analysis. Association of official analytical chemists. 17th Ed. Arlington, Virginia.

8. Aslim, B., Yuksekda, Z.N., Sarikaya, E., Beyatli, Y. 2005. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. LWT-Food Sci Technol. 38: 691-694.

9. Barbosa, M.S., Todorov, S.D., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Rabesona, H., Ivanova, I.V., Chobert, J.M., Haertle´, T., Franco, B.D.G.M. 2014. Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* MBSa1 isolated from Brazilian salami. J Appl Microbiol. 116: 1195-1208.

10. Botthoulath, V., Upaichit, A., Thumarat, U. 2018. Identification and *in vitro* assessment of potential probiotic characteristics and antibacterial effects of *Lactobacillus plantarum* subsp. *Plantarum* SKI19, a bacteriocinogenic strain isolated from Thai fermented pork sausage. J Food Sci Technol. 55: 2774-2785.

11. Caplice, E., Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. Int J Food Microbiol. 50: 131-149.

12. Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, 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: 539-545.

13. Corsetti, A., Settanni, L., Braga, T.M., de Fatima Silva Lopes, M., Suzzi, G. 2008. An investigation of the bacteriocinogenic potential of lactic acid bacteria associated with wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. LWT - Food Sci Technol. 41: 1173-1182.

14. Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Omar, N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. Int J Food Microbiol. 120: 51-70.

15. Gild, N.L., Mayer, A.M. 1999. Evidence for rapid breakdown of hydrogen peroxide by *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiol Lett. 176: 455-461.

16. Guimarães, A., Santiago, A., Teixeira, J., Venâncio, A., Abrunhosa, L. 2018. Anti-

www.SID.ir

24. Maldonado, A., Ruiz-Barba, J.L., Jime´nez-Dı´az, R. 2003. Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. Appl Environ Microbiol. 69: 383-389.
25. Nafezi, M., Tajabadi Ebrahimi, M., Eidi, M. 2015. Investigation of the probiotic effect of Iranian native *lactobacillus paracasei* against toxicity induced by aflatoxin B1 *in vivo*. J Arak Uni Med Sci. 18: 72-80.
26. Oliveira, P., Brosnan, B., Jacob, F., Furey, A., Coffey, A., Zannini, E., Arendt, E.K. 2015. Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part II: Substrate impact and mycotoxin reduction. Food Control. 51: 444-452.
27. Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M.N., Barreau, C., Richard-Forget, F. 2006. Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. FEMS Microbiol Lett. 258: 102-107.
28. Powell, J.E., Witthuhn, R.C., Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. 2007. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. Int Dairy J. 17: 190-198.
29. Sharma, N., Gupta, A., Gautam, N. 2014. Characterization of bacteriocin like inhibitory substance produced by a new strain *Brevibacillus borstelensis* AG1 isolated from 'Marcha'. Braz J Microbiol. 45: 1007-1015.
30. Tabatabaei Yazdi, F., Alizadeh-Behbahani, B., Mohebbi, M., Mortazavi, A., Ghaitaranpoure, A. 2012. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh, a traditional Iranian fermented food. Sci J Microbiol. 1: 152-159.
31. Tharmaraj, N., Shah, N.P. 2009. Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. Int Food Res J. 16: 261-276.
aflatoxigenic effect of organic acids produced by *Lactobacillus plantarum*. Int J Food Microbiol. 264: 31-38.
17. Gul, H., Ozcelik, S., Sagdic, O., Certel, M. 2005. Sourdough bread production with *Lactobacilli* and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. Proc Biochem. 40: 691-697.
18. Gulahmadov, S.G., Abdullaeva, N.F., Guseinova, N.F., Kuliev, A.A., Ivanova, I.V., Dalgalarondo, M. 2009. Isolation and characterization of bacteriocin-like inhibitory substances from lactic acid bacteria isolated from Azerbaijan cheeses. Appl Biochem Microbiol. 45: 266-271.
19. Jorgensen, J.H., Turnidge, J.D. 2015. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: Jorgensen JM, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW, editors. Manual of clinical microbiology. 11rd ed. New York. American Society of Microbiology: 1253-1273.
20. Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Cernauskas, D., Cizeikiene, D., Zadeike, D., Lele ,V., Bartkevics, V. 2018. Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for *Fusarium mycotoxin* reduction in malting wheat grains. LWT - Food Sci Technol. 89: 307-314.
21. Lavermicocca, P., Valerio, F., Visconti, A. 2003. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. Appl Environ Microbiol. 69: 634-640.
22. Magnusson, J., Schnurer, J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Appl Environ Microbiol. 67: 1-5.
23. Magnusson, J., Strom, K., Roos, S., Sjogren, J., Schnurer, J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Lett. 219: 129-135.

www.SID.ir

Archive of SID

32. Todorov, S.D., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M.B., Holzapfel,W.H. 2008. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. J Appl Microbiol. 104: 465-477.

33. Tropcheva, R., Nikolova, D., Evstatieva, Y., Danova, S. 2014. Antifungal activity and identification of Lactobacilli, isolated from traditional dairy product "katak". Anaerobe. 28: 78-84.

34. Vasiee, A.R., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Edalatian, M.R. 2014. Isolation, identification and characterization of probiotic *Lactobacilli spp*. from Tarkhineh. Int Food Res J. 21: 2487-2492.

35. Wang, H., Yan, Y., Wang, J., Zhang, H., Qi, W. 2012. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. Plos One. 7: 1-7.

www.SID.ir

Molecular identification and evaluation of antimicrobial effects of dominant LAB isolated from Tarkhineh and its bacteriocin-like substances on some foodborne microorganisms

Sarani A[1], Sadeghi A[2]*, Khomeiri M[2], Maghsoudlou Y[2], Moayedi A[2], Ebrahimi M[3]

1. MSc student of Food Biotechnology, College of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2. College of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

3. Health research center of food, drug and natural products, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran.

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

Received: 18 November 2018 Accepted: 16 February 2019

Abstract

Isolation and evaluation of the characteristics of lactic acid bacteria (LAB) from traditional fermented products have always the possibility of exposure to isolates with unique capabilities. In the present study after molecular identification of dominant LAB isolated from Tarkhineh, antibacterial and antifungal effects of the isolate and its bacteriocin-like substances on some foodborne indicators were investigated in accordance with the reference methods. Sequencing results of polymerase chain reaction led to the identification of *Lactococcus lactis* as dominant isolate. LAB isolate had proper antibacterial effect but there was no significant difference (P<0.05) between growth inhibitory diameter of *S. aureus* and *E. coli* in present of the isolate. Furthermore, the inhibitory effect of the crude supernatant was higher than that of the neutralized and treated supernatants against studied indicator bacteria. The highest reduction in the population of S. aureus (87.91%) was also observed in the presence of crude supernatant obtained from Logarithmic growth phase. The LAB isolate had the higher antifungal effect on *A. flavus* rather than *A. niger*, but the growth rate of *A. niger* compared to *A. flavus* was remarkably (P<0.05) higher in each of the third to sixth days of incubation in the presence of bacteriocin-like substances. Based on the results of this study, *Lactococcus lactis* isolate and its bacteriocin-like substrates can be used as starter culture in fermented food processing, or as bio-preservative in food and pharmaceutical industries.

Keywords: Tarkhineh, LAB isolate, antimicrobial effect, Bacteriocin-like substances.

www.SID.ir