www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۶، جلد ۶، شماره ۳، صفحات ۲۶۰-۲۴۵
Doi: 10.22101/JRIFST.2017.11.18.633

JRIFST

جداسازی، شناسایی مولکولی و ارزیابی اثر ضدقارچی جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج

معصومه احسان‌بخش[۱]، علیرضا صادقی[۲*]، مجتبی رئیسی[۳]، مریم ابراهیمی[۴]، مهدی کاشانی‌نژاد[۵]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری مواد غذایی، دانشکدهٔ صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکدهٔ صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
* نویسندهٔ مسئول(sadeghi.gau@gmail.com)
۳- استادیار، مرکز تحقیقات سلامت غلات، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
۴- دانش‌آموختهٔ دکتری تخصصی میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکدهٔ صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۵- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکدهٔ صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۰۸

واژه‌های کلیدی
اثر ضدقارچی
جدایهٔ لاکتیکی
خمیرترش سبوس برنج و گندم

چکیده

خمیرترش، اکوسیستم تخمیری مناسبی برای جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک با اثرات ضدقارچی محسوب می‌شود. در این پژوهش، ابتدا جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش‌های سبوس برنج و سبوس گندم به روش مولکولی شناسایی شدند سپس فعالیت ضدقارچی این جدایه‌ها و پالیدهٔ کشت حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون آنها به‌ترتیب براساس روش‌های کشت دولایه و لکه‌گذاری اسپور قارچ در برابر *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج توالی‌یابی محصولات PCR، *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* در خمیرترش سبوس گندم و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در خمیرترش سبوس برنج به‌عنوان جدایهٔ لاکتیکی غالب شناسایی شدند. نتایج حاصل از کشت دولایه نیز قابلیت بازدارندگی هر دو جدایهٔ لاکتیکی از رشد شاخص‌های قارچی را در مقایسه با نمونهٔ کنترل تأیید نمود. علاوه‌بر این، تأثیر بازدارندهٔ هر دو جدایهٔ لاکتیکی بر علیه *آسپرژیلوس فلاووس* به شکل معنی‌داری بیشتر از *آسپرژیلوس نایجر* بود ($P<۰/۰۵$). همچنین تأثیر بازدارندهٔ پالیده‌های کشت فاز لگاریتمی و سکون هر جدایهٔ لاکتیکی علیه *آسپرژیلوس فلاووس*، به شکل معنی‌داری متفاوت بود اما اثر بازدارندگی پالیدهٔ کشت حاصل از فاز سکون *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و فاز لگاریتمی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بر این قارچ، تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$). تأثیر بازدارندهٔ پالیدهٔ کشت حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون این دو جدایهٔ لاکتیکی بر علیه *آسپرژیلوس نایجر* نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P>۰/۰۵$).

مقدمه

باکتری‌های اسیدلاکتیک از قابلیت تولید ترکیبات ضدمیکروبی متنوعی نظیر اسیدهای آلی، دی‌استیل، استون، پراکسید هیدروژن، پپتیدهای ضدقارچی[۱] و باکتریوسین‌ها[۲] برخوردار بوده و لذا در مقابل طیف

[1] Antifungal peptides
[2] Bacteriocins

وسیعی از عوامل بیماری‌زا و مولّد فساد مؤثر می‌باشند (Galvez *et al*., 2007). اکوسیستم‌های تخمیری غلات نظیر خمیرترش، جایگاه مناسبی برای جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای قابلیت‌های ضدقارچی بشمار می‌آیند. قاعدتاً جدایه‌های لاکتیکی غالب چنین اکوسیستم‌هایی به‌واسطهٔ رقابت و غلبه بر فلور میکروبی ناخواسته در شرایط یادشده از خصوصیات بارزتری در این زمینه برخوردارند (Sadeghi *et al*., 2016). خمیرترش، مخلوطی از آب و آرد یا اجزاء آرد غلات است که توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک و مخمرها تخمیر شده باشد (De Vuyst & Vancanneyt, 2007). استفاده از خمیرترش در فراوری محصولات غلات می‌تواند منجربه بهبود عطروطعم، بافت، پذیرش کلّی، تأخیر در بیاتی، افزایش ماندگاری، بهبود ارزش تغذیه‌ای، ایجاد خواص سلامتی‌بخش و افزایش دسترسی به ترکیبات زیست‌فعال شود (Katina *et al*., 2005; Poutanen *et al*., 2009).

تاکنون مطالعه‌های فراوانی درخصوص شناسایی مولکولی و بررسی ویژگی‌های ضدقارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در انواع خمیرترش صورت گرفته است. به‌عنوان مثال، Corsetti و همکاران (۲۰۰۱) با بهره‌گیری از روش‌های مولکولی، فلور میکروبی خمیرترش‌های حاصل از ۲ نمونهٔ گندم جنوب ایتالیا را ارزیابی کرده و دریافتند که گونه‌هایی از جنس‌های *لاکتوباسیلوس*، *لوکونوستوک*، *ویسلا*، *لاکتوکوکوس* و *پدیوکوکوس*، فلور لاکتیکی غالب را به خود اختصاص دادند. Ferchichi و همکاران (۲۰۰۷) نیز با استفاده از روش‌های مولکولی، فلور میکروبی چند نمونهٔ خمیرترش فرانسوی را تعیین نمودند که براین‌اساس، فلور لاکتیکی غالب به جنس‌های *لاکتوباسیلوس*، *لوکونوستوک* و *ویسلا* تعلق داشت. همچنین Manini و همکاران (۲۰۱۵) با مطالعهٔ باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از سبوس گندم دریافتند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[1] و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس*[2] جداشده دارای فعالیت ضدقارچی در مقابل *آسپرژیلوس نایجر*[3] و *آسپرژیلوس اوریزه*[4] بودند. Simsek و همکاران (۲۰۰۶) نیز خواص ضدمیکروبی جدایه‌های لاکتیکی خمیرترش را بررسی کرده و به سویه‌هایی با قابلیت ضدمیکروبی (*لاکتوباسیلوس برویس* زیرگونهٔ *لیندنری*[5]، *لاکتوباسیلوس ویریدسنس*[6]، *پدیوکوکوس* E5[7] و *لاکتوباسیلوس دلبروکی*[8]) دست یافتند.

اخیراً قابلیت بازدارندگی برخی از جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل گندم نظیر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس سیکی*[9] (صادقی و همکاران، ۱۳۹۴) و همچنین *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[10] و *لاکتوباسیلوس برویس* (صادقی و همکاران، ۱۳۹۵) در برابر *آسپرژیلوس فلاووس*[11] نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است. علاوه‌بر این، خاصیت ضدقارچی مناسب *پدیوکوکوس استیلسی*[12] و *لاکتوباسیلوس برویس* جداشده از خمیرترش آرد کامل جو و همچنین پالیده‌های حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون آنها در برابر *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* تأیید شده است (خشایی و همکاران، ۱۳۹۶؛ کیا دلیری و همکاران، ۱۳۹۶).

تاکنون مطالعه‌های محدودی روی فلور میکروبی خمیرترش برنج صورت گرفته که منجربه شناسایی *لاکتوباسیلوس‌هایی* همچون *پارالیمنتاریوس*[13]، *پرولنس*[14]، *فرمنتوم*[15]، *پونتیس*[16] و *اسپیچری*[17] شده است (Meroth *et al*., 2004). Farahmand و همکاران (۲۰۱۵) نیز نشان داده‌اند که استفاده از خمیرترش سبوس برنج حاوی کشت‌های آغازگر لاکتیکی، از قابلیت ممانعت‌کنندگی مناسبی در برابر رشد *آسپرژیلوس نایجر* و *پنیسیلیوم ایتالیکوم*[18] در نان

[1] *Lactobacillus plantarum*
[2] *Pediococcus pentosaceus*

[3] *Aspergillus niger*
[4] *Aspergillus oryzae*
[5] *Lactobacillus brevis sp. lindneri*
[6] *Lactobacillus viridenscens*
[7] *Pediococcus sp.* E5
[8] *Lactobacillus delbrueckii*
[9] *Lactobacillus sakei*
[10] *Lactobacillus acidophilus*
[11] *Aspergillus* flavus
[12] *Pediococcus stilesii*
[13] *L. paralimentarius*
[14] *L. perolens*
[15] *L. fermentum*
[16] *L. pontis*
[17] *L. spicheri*
[18] *Penicillium italicum*

تولیدی برخوردار است.

بررسی فلور میکروبی زیستگاه‌هایی همچون خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند احتمال مواجهه با میکروارگانیسم‌های دارای ویژگی‌های منحصربه‌فرد نظیر قابلیت ضدقارچی را در پی خواهد داشت. هدف از این مطالعه؛ جداسازی، شناسایی مولکولی و ارزیابی خواص ضدقارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک غالب خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج و همچنین پالیده‌های کشت حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون آنها در برابر *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* به‌عنوان برخی از مهم‌ترین قارچ‌های شاخص در فراورده‌های غذایی بود.

مواد و روش‌ها

مواد خام

در این پژوهش پس از تهیهٔ آرد سبوس گندم (مخلوطی از چند واریته) و آرد سبوس برنج (واریتهٔ طارم هاشمی)، برخی از ویژگی‌های آنها نظیر درصد رطوبت، پروتئین، خاکستر و غیره براساس روش‌های مدون (AACC, 2010) تعیین گردید. مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مصرفی نیز از شرکت مرک آلمان و کشت‌های لیوفیلیزه باکتری‌ها و قارچ‌های مورد استفاده شامل *لاکتوباسیلوس* (*Lactobacillus* sp. PTCC 1332)، *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger* PTCC 5012) و *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus* PTCC 5006) از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد.

تهیهٔ خمیرترش

برای تهیهٔ خمیرترش از آردهای سبوس گندم و سبوس برنج، براساس میزان راندمان خمیر[1] (نسبت خمیر به آرد × ۱۰۰) به ترتیب معادل ۴۵۰ و ۱۶۰ پس از تهیهٔ نسبت مناسب، خمیرترش تولیدی در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت تخمیر شد (Katina *et al*., 2012). لازم به توضیح است که هرچند راندمان خمیر مناسب برای فراوری خمیرترش سبوس غلات حدود ۴۵۰ می‌باشد اما به‌دلیل آلودگی کپکی سریع خمیرترش سبوس برنج تولیدشده با این نسبت، نهایتاً نسبت ۱۶۰ برای فراوری خمیرترش سبوس برنج مورد استفاده قرار گرفت. سپس در هر روز، ۲۰ درصد از خمیرترش روز قبل به مخلوط آب و آرد، اضافه شد (مایه‌گیری)[2] و دوباره در گرمخانه با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت (Sadeghi *et al*., 2016).

ارزیابی pH و اسیدیته

برای تعیین اسیدیتهٔ قابل تیتر[3] (TTA) خمیرترش برحسب اسیدلاکتیک، ۱۰ گرم خمیرترش و ۹۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر با NaOH ۰/۱ مولار تا رسیدن به pH معادل ۸/۵ تیتر شد و سپس اسیدیته برحسب میلی‌لیتر NaOH مصرفی گزارش گردید (Katina *et al*., 2012). برای محاسبهٔ pH نمونه‌های خمیرترش نیز از pHمتر (Knick، Calimatic 766، ساخت آلمان) استفاده گردید.

جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک غالب

جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک غالب خمیرترش‌های تولیدی پس از ۴ بار تکرار فرایند مایه‌گیری خمیرترش تا رسیدن pH به حدود ۴ تا ۴/۵ و ثبات نسبی اسیدیتهٔ قابل تیتر آنها پس از دو فرایند مایه‌گیری متوالی صورت گرفت (Sadeghi *et al*., 2016). برای دستیابی به تک پرگنهٔ خالص جدایه‌های لاکتیکی غالب، پس از تهیهٔ رقت‌های متوالی و کشت سطحی سوسپانسیون خمیرترش روی محیط کشت MRS Agar، کشت یادشده در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از مطالعهٔ مورفولوژی میکروسکوپی جدایه‌های لاکتیکی، نهایتاً از پرگنهٔ آنها کشت خطی تهیه گردید و آزمون‌های گرم و کاتالاز روی جدایه‌ها انجام شد.

استخراج DNA

استخراج DNA از تک پرگنهٔ کشت خالص جدایه‌های مورد نظر با استفاده از کیت استخراج DNA (بیونر-K

[1] Dough Yield

[2] Back Slopping

[3] Total Titratable Acidity

3032[1]، ساخت کره جنوبی) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

واکنش PCR

پس از استخراج DNA به‌منظور شناسایی جدایه‌های لاکتیکی از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) دارای پرایمرهای اختصاصی برای باکتری‌های اسیدلاکتیک استفاده شد. توالی هدف تکثیر، بخشی از جایگاه 16S rDNA به طول ۱۵۰۰ جفت باز بود. مقادیر واکنشگرهای PCR (روبوست[2]، فرانسه) و چرخه‌های دمایی تکثیر (ترموسایکلر کوربت[3]، استرالیا) مطابق روش Abnous و همکاران (۲۰۰۹) پس از بهینه‌سازی اجرا گردید. واکنش بهینهٔ PCR در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر شامل ۱۵ میکرولیتر Red 2X Master Mix (آمپلیکون[4]، دانمارک)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۳ میکرولیتر DNA و ۱۱ میکرولیتر آب‌مقطر صورت گرفت. در مرحلهٔ اول تکثیر توالی هدف، واسرشت DNA با شروع داغ در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، آغاز گشته و طی ۳۰ چرخه با برنامهٔ حرارتی ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه ادامه یافت. سرانجام، مرحلهٔ تکثیر انتهایی نیز به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد خاتمه پیدا کرد. برای تأیید اولیهٔ تکثیر، محصولات PCR به ژل آگارز ۱/۲ درصد واجد رنگ سایبر سیف[5] (اینوایتروژن[6]، آمریکا) منتقل و در بافر TBE[7] الکتروفورز گردید. محصول تکثیر PCR نیز نیز برای تأیید نهایی و تعیین توالی به شرکت MWG آلمان ارسال گردید. سرانجام هم‌ردیفی توالی‌های حاصل با استفاده از رویهٔ BLASTn با داده‌های موجود در بانک جهانی ژن منجربه شناسایی جدایه‌های لاکتیکی شد. برای بررسی رابطهٔ فیلوژنتیکی جدایه‌های لاکتیکی نیز ابتدا از نرم‌افزار BioEdit نسخهٔ ۷.۲.۵ و پایگاه اطلاعاتی multalin به‌ترتیب به‌منظور تعیین تنوع نوکلئوتیدی و تفاوت ردیف نوکلئوتیدی توالی هدف PCR استفاده شد. سپس به کمک آنالیز ایندکس عدم توافق[8] براساس فاصلهٔ ترکیب نوکلئوتیدی این توالی‌ها، هاپلوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخهٔ ۷ مورد مطالعه قرار گرفتند. درنهایت توالی‌های یادشده با استفاده از رویهٔ CLUSTAL موجود در نرم‌افزار MEGA هم‌ردیف و سپس نمودار درختی با استفاده از رویهٔ بیشترین درست‌نمایی[9] به کمک نرم‌افزار MEGA ترسیم گردید. به‌منظور تأیید درخت ترسیم‌شده نیز از روش Bootstrap (با تعداد ۱۰۰۰) در نرم‌افزار MEGA استفاده گردید (Kristensen *et al.*, 2011).

تعیین فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه‌های لاکتیکی

برای ارزیابی تأثیر ضدقارچی پالیدهٔ کشت فازهای مختلف رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک غالب، فازهای رشد لگاریتمی و سکون آنها به روش کدورت‌سنجی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (پی‌جی‌اینسترومنتز[10]، انگلستان) در فواصل زمانی مشخص در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد (Gulahmadov *et al.*, 2009).

تعیین خواص ضدقارچی

برای ارزیابی خاصیت ضدقارچی جدایه‌های لاکتیکی و پالیدهٔ کشت آنها به‌ترتیب از روش‌های کشت دولایه[11] لکه‌گذاری اسپور قارچ استفاده شد.

روش کشت دولایه

به‌منظور بررسی خاصیت ضدقارچی جدایه‌های لاکتیکی فعال در مقابل ۲ قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* از روش کشت دولایه استفاده گردید. بدین‌منظور ابتدا پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS Agar تهیه شد و با سوآب استریل از کشت فعال جدایه‌های لاکتیکی، خطوطی به طول ۳ سانتی‌متر با فاصلهٔ متناسب از یکدیگر در مرکز پلیت‌های یادشده کشیده شد و سپس به مدت ۷۲

[1] Bioneer
[2] Robust
[3] Corbett
[4] Amplicon
[5] SYBR safe
[6] Invitrogen
[7] Tris Boric Acid EDTA
[8] Disagreement index analysis
[9] Maximum likelihood
[10] T80 Double Beam UV-Visible ،PGI
[11] Overlay method

ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. برای تهیهٔ سوسپانسیون اسپور قارچ‌های یادشده، پلیت‌های کشت‌داده‌شده آنها در محیط YGC[1] به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. پس از گرم‌خانه‌گذاری، اسپورها با استفاده از آب‌مقطر استریل، شسته و جمع‌آوری گردیدند. شمارش اسپورها نیز با استفاده از لام هموسیتومتر[2] انجام شد و اسپورها تا 10^5 عدد در هر میلی‌لیتر رقیق گردیدند. سپس مخلوط حاوی ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور با ۹ میلی‌لیتر محیط کشت YGC Agar روی خطوط کشت‌داده‌شده جدایهٔ لاکتیکی به‌صورت کشت دولایه ریخته شد و پس از انعقاد لایهٔ دوم، پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردیدند. قطر هالهٔ عدم رشد قارچ در اطراف خطوط کشت‌داده‌شده جدایهٔ لاکتیکی نیز با استفاده از نرم‌افزار Image J به‌صورت روزانه اندازه‌گیری شد (Magnusson *et al*., 2003). تمامی مراحل یادشده به‌غیراز کشت جدایه‌ها برای نمونه‌های کنترل نیز انجام گرفت.

تهیهٔ پالیدهٔ کشت جدایه‌های لاکتیکی

برای تهیهٔ پالیدهٔ کشت جدایه‌های لاکتیکی، کشت حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون آنها با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (هانیل[3]، کره جنوبی) گردید. سپس مایع رویی به‌دست‌آمده از فیلتر سرنگی (جت بیوفیل[4]، چین) ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد (Lavermicocca *et al*., 2003).

روش لکه‌گذاری اسپور

برای ارزیابی خاصیت ضدقارچی پالیدهٔ کشت جدایه‌های لاکتیکی نیز از روش لکه‌گذاری اسپور قارچ استفاده شد. بدین‌منظور در هر پلیت، ۱۰ میلی‌لیتر از مخلوط هریک از پالیده‌ها و YGC با نسبت ۱ به ۹ ریخته شد. از محیط کشت YGC Agar بدون پالیده نیز به‌عنوان نمونهٔ کنترل استفاده گردید. در این آزمایش، مرکز هر پلیت با ۳ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور تهیه‌شده در مرحلهٔ قبل، لکه‌گذاری گردید. سپس پلیت‌ها تا زمانی که قارچ در نمونهٔ کنترل، تمام سطح پلیت را پوشاند در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شده و بازدارندگی پالیده‌ها بر رشد قارچ به‌صورت روزانه با تعیین قطر کلنی قارچ در هر نمونه در مقایسه با نمونهٔ کنترل بررسی گردید (Wang *et al*., 2012).

آنالیز آماری

تمام آزمون‌ها با ۳ تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. متغیرهای مستقل آزمون ارزیابی اسیدیتهٔ قابل تیتر خمیرترش شامل نوع خمیرترش و زمان تخمیر، متغیر مستقل آزمون ارزیابی خاصیت ضدقارچی به روش کشت دولایه شامل نوع باکتری اسیدلاکتیک و متغیرهای مستقل آزمون ارزیابی خاصیت ضدقارچی به روش لکه‌گذاری اسپور قارچ شامل نوع پالیده و نوع قارچ بودند (متغیر وابسته در هر ۲ آزمون ضدقارچی نیز میزان رشد کپک بود). برای مقایسهٔ میانگین از آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح ۵ درصد استفاده گردید. برای مقایسهٔ میانگین اسیدیتهٔ قابل تیتر ۲ نوع خمیرترش با یکدیگر و همچنین مقایسهٔ میانگین رشد ۲ قارچ با یکدیگر نیز از آزمون T (t-test) استفاده شد. برای آنالیز آماری و ترسیم نمودارها نیز نرم‌افزارهای SPSS نسخهٔ ۱۹ و Excel نسخهٔ ۲۰۱۰ مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج و بحث

ویژگی‌های مواد خام و تغییرات اسیدیتهٔ قابل تیتر در طی فرایند مایه‌گیری خمیرترش

ویژگی‌های آردهای سبوس گندم و سبوس برنج مورد استفاده در این پژوهش در جدول (۱) ارائه شده است. روند تغییرات اسیدیتهٔ قابل تیتر خمیرترش‌های تولیدی نیز در طی ۴ روز متوالی تکرار فرایند مایه‌گیری در شکل (۱) نشان داده شده است. همان‌طورکه مشاهده می‌گردد با افزایش زمان تخمیر، میزان اسیدیتهٔ قابل تیتر خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج نیز افزایش یافت که در مورد خمیرترش

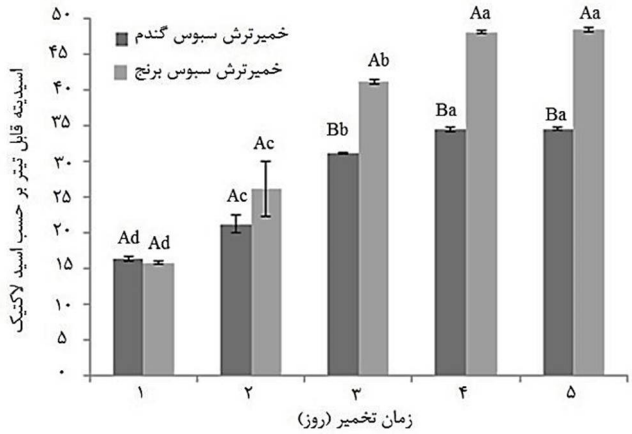
[1] Yeast extract glucose chloramphenicol agar
[2] Hemocytometer
[3] R combi 514 ،Hanil
[4] Jet Biofil

سبوس برنج این افزایش به جزء تخمیر روز اول در مقایسه با خمیرترش سبوس گندم همواره بیشتر بود. علاوه‌بر این، مقادیر اسیدیتهٔ قابل تیتر خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج، در هر روز (به جزء روزهای اول و دوم) از اختلاف معنی‌داری برخوردار بودند ($P<۰/۰۵$).

مقایسهٔ مقادیر اسیدیتهٔ قابل تیتر خمیرترش سبوس برنج طی ۴ روز متوالی تکرار فرایند مایه‌گیری نیز حاکی از اختلاف معنی‌دار طی روزهای اول تا ۴ بود ولی در روزهای ۴ و ۵، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). مقادیر اسیدیتهٔ قابل تیتر خمیرترش سبوس گندم نیز تا روز ۴ تکرار متوالی فرایند مایه‌گیری دارای اختلاف معنی‌داری بودند ($P<۰/۰۵$) اما بین مقادیر اسیدیته در روزهای ۴ و ۵ اختلافی مشاهده نشد.

جدول ۱ - ویژگی‌های آردهای سبوس گندم و سبوس برنج مورد استفاده در این پژوهش

نوع آرد	درصد پروتئین	درصد خاکستر	درصد رطوبت	درصد چربی	درصد کربوهیدرات
سبوس گندم	۱۴/۰	۵/۹	۱۱/۸۸	۲/۲۸	۳۷/۲
سبوس برنج	۱۱/۸	۲۵/۹	۸/۵۲	۱۱/۶۷	۳۳/۶



شکل ۱- اسیدیتهٔ قابل تیتر خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج برحسب اسیدلاکتیک. حروف بزرگ ناهمسان، نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار بین مقادیر اسیدیتهٔ خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج در هر روز تخمیر و حروف کوچک ناهمسان، نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار بین مقادیر اسیدیتهٔ هر نوع خمیرترش طی ۴ روز متوالی تکرار فرایند مایه‌گیری در سطح ۰/۰۵ است.

Katina و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی تأثیر زمان تخمیر خمیرترش حاصل از سبوس گندم با DY معادل ۴۵۰ در دماهای ۲۰ و ۳۲ درجهٔ سانتی‌گراد دریافتند که بیشترین مقدار TTA پس از ۲۰ ساعت تخمیر به‌دست آمد که معادل ۱۳/۶ بود. Axel و همکاران (۲۰۱۶) نیز با بررسی ویژگی‌های خمیرترش با DY معادل ۲۰۰ تهیه‌شده از آردهای کوانیوا[1] و برنج با تلقیح *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس روتری*[2] گزارش کردند که بیشترین مقدار اسیدیتهٔ قابل تیتر برای خمیرترش کوانیوا تلقیح‌شده با *لاکتوباسیلوس روتری*، معادل ۲۸/۵ و برای خمیرترش برنج اسیدی‌شده با مواد شیمیایی، ۱۷/۱ بود. همچنین تغییرات اسیدیتهٔ قابل تیتر خمیرترش برنج، ۱۰/۵-۱۷/۱ گزارش شد که به یافته‌های پژوهش حاضر نسبتاً نزدیک است. Meroth و همکاران (۲۰۰۴) دریافتند که تخمیر کنترل‌نشده خمیرترش برنج در روز نخست تخمیر به اسیدیتهٔ قابل تیتر حدود ۲۰ رسید که در مقایسه با نتایج پژوهش حاضر در روز نخست تخمیر، مقادیر کمتری را نشان داد.

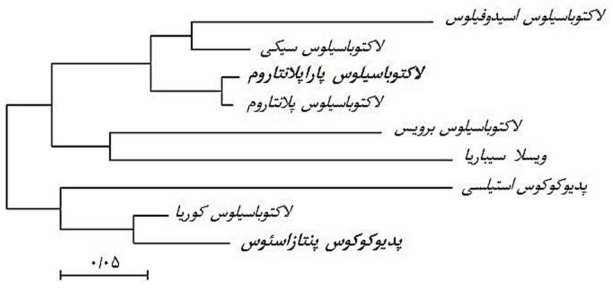
[1] Quinoa
[2] *Lactobacillus reuteri*

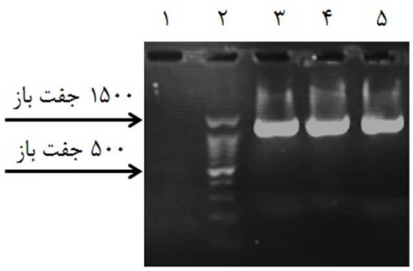
در پژوهش Manini و همکاران (۲۰۱۵) مشخص شد که نرخ اسیدی‌شدن خمیرترش سبوس گندم هنگام استفاده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس سیکی*، *لاکتوباسیلوس کورواتوس*[1] و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* دارای بیشترین مقادیر بود. عموماً باکتری‌های اسیدلاکتیک با قابلیت تولید اسید کمتر به زمان طولانی‌تری برای تخمیر نیاز دارند.

تفاوت مقادیر اسیدیتهٔ خمیرترش‌های مورد بررسی می‌تواند به‌دلیل تفاوت در ترکیبات آرد (بخصوص محتوای خاکستر و پروتئین)، شرایط تخمیر (دما و زمان)، مقدار رطوبت، DY و تعداد دفعات مایه‌گیری باشد. به‌دلیل طبیعت مادهٔ خام و نوع آرد (گندم، چاودار و غیره و یا حتی انواع آنها) و همچنین بسته به شرایط تخمیر هر خمیرترشی به‌عنوان یک اکوسیستم ویژه در نظر گرفته می‌شود که ترکیب میکروبی آن به لحاظ تعداد سلول، تنوع و ترکیب نژادی برای یک دورهٔ زمانی نسبتاً طولانی، تقریباً پایدار باقی می‌ماند. ازسوی‌دیگر، تفاوت در عوامل مؤثر بر اکوسیستم‌های پیچیدهٔ میکروبی نظیر مادهٔ اولیه، شرایط فرایند و فلور میکروبی غالب، خود دلیل بروز برخی از تفاوت‌های مشاهده‌شده در نتایج مطالعهٔ حاضر در مقایسه با پژوهش‌های دیگر بشمار می‌آید. اصولاً فرایند تخمیر خمیرترش به عوامل متعددی نظیر ترکیب فلور میکروبی آن، فعالیت آنزیمی و همچنین قابلیت تخمیری آرد نیز بستگی دارد. در کنار عوامل یادشده، حتی شرایط جغرافیایی و اقلیمی نیز بر پیچیدگی این اکوسیستم، افزوده و منجربه ایجاد طیف گسترده‌ای از انواع خمیرترش‌های محلّی مخصوص به هر کشور با خصوصیات و همچنین قابلیت‌های منحصربه‌فرد شده است (De Vuyst & Neysens, 2005).

شناسایی جدایه‌های لاکتیکی

به‌منظور شناسایی جدایه‌های لاکتیکی غالب پس از ۴ روز تکرار فرایند مایه‌گیری خمیرترش، باکتری‌های اسیدلاکتیک هر خمیرترش به روشی که قبلاً توضیح داده شد جدا گردیدند. نتایج آزمون‌های اولیه نیز گرم مثبت و کاتالاز منفی‌بودن جدایه‌ها را تأیید نمود. همان‌طورکه در شکل (۲) نیز مشخص است ژل الکتروفورز محصولات PCR نیز مویّد تکثیر توالی هدف ۱۵۰۰ جفت بازی بود. نتایج توالی‌یابی محصولات PCR پس از مقایسهٔ هم‌ردیفی با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن، منجربه شناسایی *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم*[2] (شمارهٔ دسترسی NR_025447.1 با ۹۷ درصد تشابه) و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* (شمارهٔ دسترسی NR_042058.1 با ۹۶ درصد تشابه) به‌ترتیب به‌عنوان جدایهٔ لاکتیکی غالب خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج شد. درخت فیلوژنی[3] ترسیم‌شده نیز وابستگی جدایه‌های یادشده را با برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیک مرسوم موجود در انواع خمیرترش نشان می‌دهد (شکل۲).





شکل ۲- ژل الکتروفورز محصولات PCR با توالی هدف ۱۵۰۰ جفت باز جهت شناسایی جدایهٔ لاکتیکی غالب خمیرترش‌های سبوس برنج و سبوس گندم (لاین ۳ و ۴) در مجاورت مارکر DNA ۲ کیلو جفت بازی (لاین ۲) و همچنین نمونهٔ کنترل مثبت حاوی DNA حاصل از کشت خالص *Lactobacillus* sp (لاین ۵) و نمونهٔ کنترل منفی فاقد DNA (لاین ۱) و رابطهٔ فیلوژنتیکی جدایه‌های لاکتیکی با برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیک مرسوم موجود در انواع خمیرترش براساس رویهٔ بیشترین درست‌نمایی. خط نشانه، ۰/۰۵ جایگزینی در هر ۱۰۰ نوکلئوتید را نشان می‌دهد.

[1] *Lactobacillus curvatus*

[2] *Lactobacillus paraplantarum*

[3] Phylogenetic tree

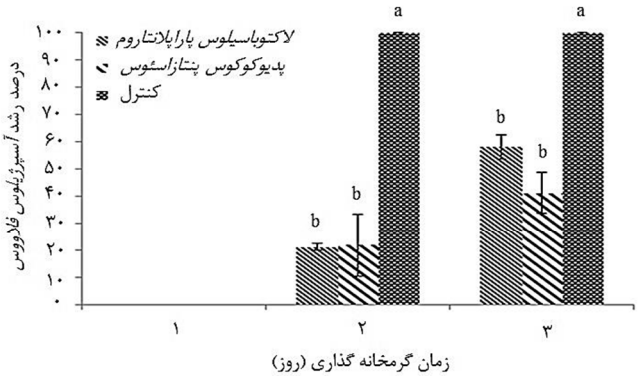
Katina و همکاران (۲۰۱۲) طی تخمیر خودبه‌خودی سبوس گندم با جمعیت میکروبی غالب متفاوتی از گونه‌های هتروفرمنتاتیو[1] اجباری همچون *ویسلا سیباریا*[2] و *ویسلا کنفوسا*[3] مواجه شدند. Simsek و همکاران (۲۰۰۶) نیز از ۶۰ نمونه خمیرترش جمع‌آوری‌شده از نانوایی‌های سنتی ترکیه، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس ویریدسنس*، *لاکتوباسیلوس برویس* زیرگونهٔ *لیندنری*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس سیکی* و گونه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس* و *پدیوکوکوس* را جداسازی کردند. Manini و همکاران (۲۰۱۵) نیز ۱۳ باکتری اسیدلاکتیک جداشده از خمیرترش سبوس گندم را شناسایی کردند که شامل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس سیکی*، *لاکتوباسیلوس کورواتوس*، *لوکونوستوک مزنتریودس*[4]، *لوکونوستوک سیتروروم*[5] و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بودند. Robert و همکاران (۲۰۰۹) نیز در بررسی تنوع زیستی باکتری‌های اسیدلاکتیک خمیرترش‌های فرانسوی دریافتند که ۳۸ درصد از باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده به جنس *پدیوکوکوس* تعلق داشتند. براساس نتایج مطالعهٔ ابراهیمی و همکاران (۱۳۹۶)، آنالیز درخت فیلوژنتیکی توالی‌های هم‌ردیف‌شده ۴ جدایهٔ لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو نشان داد که *لاکتوباسیلوس کوریا*[6] و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* دارای قرابت فیلوژنتیکی بسیار زیادی به یکدیگر بودند درحالی‌که بیشترین فاصلهٔ ژنتیکی نیز بین *لاکتوباسیلوس برویس* و *ویسلا سیباریا* مشاهده گردید.

فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه‌های لاکتیکی

نتایج به‌دست‌آمده از تعیین فازهای رشد لگاریتمی و سکون نشان داد که *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس*، ۱۷ ساعت پس از شروع زمان گرم‌خانه‌گذاری به انتهای فاز رشد لگاریتمی خود رسیدند. لذا برای ارزیابی خاصیت ضدقارچی پالیدهٔ کشت این جدایه‌ها در فازهای رشد لگاریتمی و سکون به‌ترتیب ۱۵ و ۱۹ ساعت پس از کشت جدایه‌ها، پالیده به روشی که قبلاً توضیح داده شد، تهیه گردید.

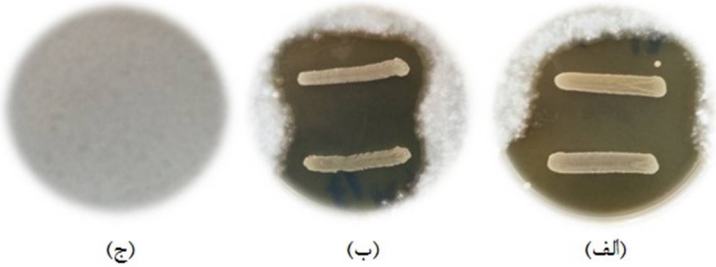
خاصیت ضدقارچی *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* به روش کشت دولایه

تأثیر بازدارندگی *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در هر روز در مقایسه با نمونهٔ کنترل که با آزمون کشت دولایهٔ بررسی‌شده در شکل‌های (۳) و (۴) آمده است. همان‌طورکه در این تصاویر مشاهده می‌شود در روز اول، رشد قارچ مشاهده نشد اما در روزهای ۲ و ۳، اختلاف میزان بازدارندگی هر دو جدایهٔ لاکتیکی در مقایسه با نمونهٔ کنترل بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس*، معنی‌دار بود ولی بین اثر بازدارندگی دو جدایهٔ لاکتیکی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($P>۰/۰۵$).



شکل ۳- درصد رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در حضور جدایه‌های لاکتیکی در مقایسه با نمونهٔ کنترل به روش کشت دولایه. حروف ناهمسان در هر روز، نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است

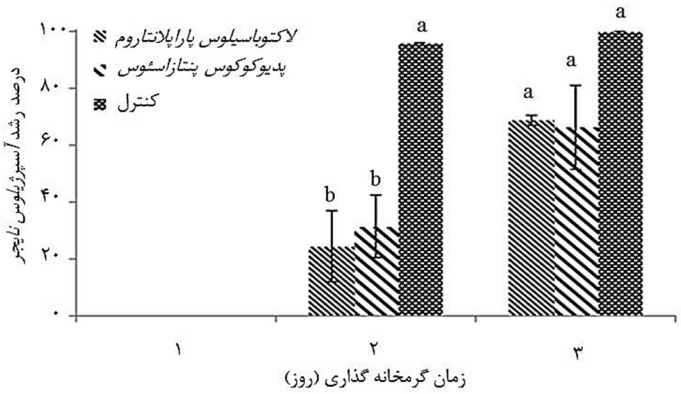
[1] Heterofermentative
[2] *Weissella cibaria*
[3] *Weissella confusa*
[4] *Leuconostoc mesenteroides*
[5] *Leuconostoc citreum*
[6] *Lactobacillus curieae*



شکل ۴- هالهٔ عدم رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در حضور *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* (الف) و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* (ب) در مقایسه با نمونهٔ کنترل (ج) پس از ۲ روز گرم‌خانه‌گذاری به روش کشت دولایه

اثر بازدارندگی باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج بر رشد *آسپرژیلوس نایجر* نیز در هر روز در مقایسه با نمونهٔ کنترل که با آزمون کشت دولایهٔ بررسی‌شده در شکل‌های (۵) و (۶) آمده است. در روز اول گرم‌خانه‌گذاری، رشد قارچ مشاهده نشد اما در روز دوم، اختلاف درصد بازدارندگی هر دو جدایهٔ لاکتیکی در مقایسه با نمونهٔ کنترل روی *آسپرژیلوس نایجر*، معنی‌دار بود ولی بین اثر بازدارندگی ۲ جدایهٔ لاکتیکی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($P>۰/۰۵$). در روز ۳ نیز اختلاف درصد بازدارندگی دو جدایه بر رشد *آسپرژیلوس نایجر* معنی‌دار نبود.

براساس نتایج مطالعهٔ حاضر در روز ۳ گرم‌خانه‌گذاری، تأثیر بازدارندگی هر ۲ جدایهٔ لاکتیکی بر علیه *آسپرژیلوس فلاووس* بیشتر از *آسپرژیلوس نایجر* بود. فعالیت ضدقارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک باتوجه‌به نژاد و گونهٔ آنها بسیار متفاوت می‌باشد. علاوه‌بر این، عوامل زیادی بر میزان تأثیرگذاری ترکیبات ضدقارچی تولیدشده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک مؤثر است که از آن جمله می‌توان به pH، زمان گرم‌خانه‌گذاری و نوع متابولیت‌های تولیدی اشاره کرد (Magnusson *et al*., 2003). خشایی و همکاران (۱۳۹۶) نیز گزارش کردند که بین خاصیت ضدقارچی *پدیوکوکوس استیلسی* جداشده از خمیرترش آرد جو روی قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$) اما خاصیت ضدقارچی این جدایهٔ لاکتیکی روی *آسپرژیلوس نایجر* تا حدی بیشتر از *آسپرژیلوس فلاووس* بود.



شکل ۵- درصد رشد *آسپرژیلوس نایجر* در حضور جدایه‌های لاکتیکی در مقایسه با نمونهٔ کنترل به روش کشت دولایه. حروف ناهمسان در هر روز، نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

شکل ۶- هالهٔ عدم رشد *آسپرژیلوس نایجر* در حضور *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* (الف) و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* (ب) در مقایسه با نمونهٔ کنترل (ج) پس از ۲ روز گرم‌خانه‌گذاری به روش کشت دولایه

در مطالعهٔ Magnusson و همکاران (۲۰۰۳) اثر ضدقارچی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* و *پدیوکوکوس پارولوس*[1] روی قارچ‌های *آسپرژیلوس*، بررسی و گزارش شد که خاصیت ضدقارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک نه تنها به تولید اسیدهای آلی (اسیداستیک و اسیدلاکتیک) مربوط می‌شود بلکه دی‌پپتیدهای حلقوی و ترکیبات دیگر نظیر ۴-هیدروکسی فنیل پروپانوئیک اسید، فنیل پروپانوئیک اسید[2] و فنیل لاکتیک اسید[3] نیز در خاصیت ضدقارچی آنها نقش دارند.

خاصیت ضدقارچی پالیده‌های کشت *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* به روش لکه‌گذاری اسپور

تعیین درصد بازدارندگی پالیدهٔ حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* به روش لکه‌گذاری اسپور تا روز ۶ که قارچ‌ها به‌طور کامل سطح پلیت کنترل را پوشاندند، ادامه یافت (جدول ۲ و شکل ۷). براساس نتایج به‌دست‌آمده، پالیدهٔ حاصل از فاز رشد لگاریتمی *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم*، بیشترین و پالیدهٔ حاصل از فاز رشد سکون *پدیوکوکوس پنتازاسئوس*، کمترین اثر بازدارندگی را بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* داشتند. بیشترین اثر بازدارنگی در برابر *آسپرژیلوس نایجر* نیز به پالیدهٔ حاصل از فاز سکون *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و کمترین اثر بازدارندگی به پالیدهٔ حاصل از فاز سکون *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* تعلق داشت. در روز اول، رشد قارچ مشاهده نشد اما از روز دوم، میزان رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در محیط کنترل نسبت به محیط‌های حاوی پالیده‌های حاصل از کشت جدایه‌های یادشده در فازهای رشد لگاریتمی و سکون بیشتر بود. همان‌طورکه ملاحظه می‌گردد بین بازدارندگی پالیده‌های کشت فاز لگاریتمی و سکون هر جدایهٔ لاکتیکی علیه *آسپرژیلوس فلاووس*، اختلاف معنی‌داری وجود داشت اما بین بازدارندگی پالیدهٔ کشت حاصل از فاز سکون *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و فاز لگاریتمی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بر این قارچ، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P<۰/۰۵$). تأثیر بازدارندهٔ پالیدهٔ کشت حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون این دو جدایهٔ لاکتیکی بر علیه *آسپرژیلوس نایجر* نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P>۰/۰۵$). علاوه‌بر این، تفاوت تأثیر بازدارندهٔ پالیدهٔ کشت حاصل از هر فاز رشد این جدایه‌های لاکتیکی بر *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* (که در جدول۲ با حروف بزرگ نشان داده شده) با یکدیگر معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$).

Cizeikiene و همکاران (۲۰۱۳) با جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک نظیر *لاکتوباسیلوس سیکی*، *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی*[4] و ۲ سویه از *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* دریافتند که این جدایه‌ها دارای توانایی تولید اسیدهای آلی و ترکیبات شبه باکتریوسینی بوده و اثر ضدقارچی در برابر *آسپرژیلوس نایجر* داشتند. جدایه‌های یادشده حتی قادر بودند که از شکل‌گیری اسپور این قارچ نیز ممانعت نمایند. این محققین با تجزیهٔ متابولیت‌های تولیدی توسط این

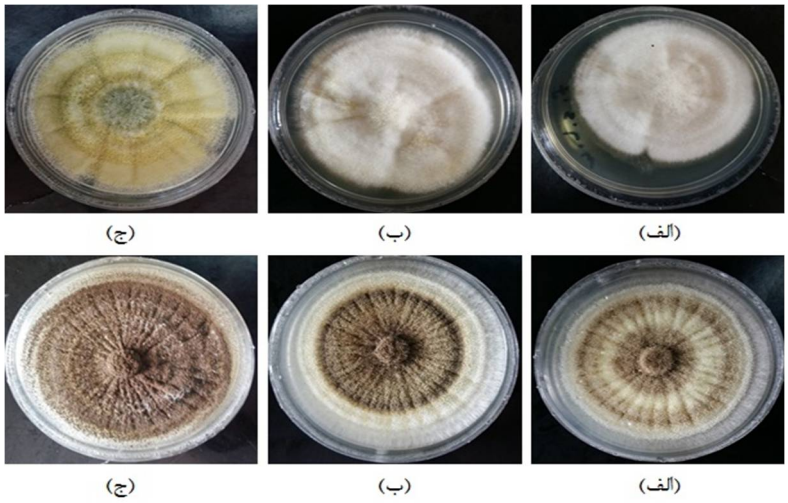
[1] *Pediococcus parvulus*
[2] Phenyl propanoic acid
[3] Phenyl Lactic Acid
[4] *Pediococcus diacetilactici*

باکتری‌ها، به ماهیت پروتئینی آنها پی برده و احتمال دادند که این ترکیبات از انواع شبه باکتریوسین‌ها باشند. کیا دلیری و همکاران (۱۳۹۶) نیز گزارش کردند که پالیدهٔ خام فاز لگاریتمی *لاکتوباسیلوس برویس* جداشده از آرد کامل جو نسبت به پالیدهٔ خام حاصل از فاز سکون جدایهٔ یادشده به شکل معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) از تأثیر بازدارندگی بیشتری بر *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* برخوردار بود. در مطالعهٔ Hassan و Bullerman (۲۰۰۸)، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*[1] جداشده از خمیرترش اثر قابل توجهی بر *آسپرژیلوس نایجر* نداشت درحالی‌که سایر جدایه‌های لاکتیکی از رشد این قارچ و شکل‌گیری کنیدی‌ها ممانعت کردند.

جدول ۲- مقایسهٔ درصد بازدارندگی پالیدهٔ حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج پس از ۶ روز گرم‌خانه‌گذاری به روش لکه‌گذاری اسپور

پالیده / قارچ	فاز لگاریتمی *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم*	فاز سکون *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم*	فاز لگاریتمی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس*	فاز سکون *پدیوکوکوس پنتازاسئوس*
آسپرژیلوس فلاووس	۳۹/۴۲±۰/۰۷۵^{Aa}	۲۱/۱±۰/۸۹^{Bb}	۲۲/۲۱±۴/۳۸^{Ab}	۱۵/۹۲±۰/۶۸^{Ac}
آسپرژیلوس نایجر	۱۸/۲۸±۰/۴۴^{Ba}	۲۴/۴۳±۵/۳۸^{Aa}	۱۳/۴۱±۴/۹۴^{Ba}	۱۳/۱۱±۲/۸۷^{Ba}

حروف کوچک ناهمسان، نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار بین درصد بازدارندگی پالیدهٔ کشت جدایه‌های لاکتیکی حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون روی هر قارچ (در هر ردیف) و حروف بزرگ ناهمسان، نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار بین درصد بازدارندگی رشد ۲ قارچ با یکدیگر (در هر ستون) در سطح ۰/۰۵ است.



شکل ۷- هالهٔ عدم رشد *آسپرژیلوس فلاووس* (شکل‌های بالا) و *آسپرژیلوس نایجر* (شکل‌های پایین) در حضور *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* (الف)، *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* (ب) و نمونه کنترل (ج) به روش لکه‌گذاری اسپور قارچ

این محققین با بررسی باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از خمیرترش سبوس گندم گزارش کردند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کورواتوس* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بیشترین فعالیت ضدقارچی را در برابر *آسپرژیلوس اوریزه* و فعالیت متوسطی در برابر *آسپرژیلوس نایجر* داشتند. Gupta و Srivastava (۲۰۱۴) در مطالعهٔ دیگری نشان دادند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به‌دلیل تولید اسیدلاکتیک، و پراکسید هیدروژن و همچنین رقابت در استفاده از مواد مغذی و تولید ترکیبات شبه باکتریوسینی دارای خاصیت ضدقارچی است.

در پژوهش Varsha و همکاران (۲۰۱۴) فعالیت ضدقارچی نان حاوی *لاکتوکوکوس‌ها* در برابر *آسپرژیلوس نایجر* و *فوزاریوم اکسیسپوروم*[2] حاکی از فعالیت سینرژیستی مخمر نانوایی و باکتری‌های اسیدلاکتیک در برابر قارچ‌های یادشده بود.

[1] *Lactobacillus paracasei*
[2] *Fusarium oxysporum*

Lavermicocca و همکاران (۲۰۰۰) نیز پس از جداسازی گونه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک[1] از خمیرترش و بررسی فعالیت ضدقارچی آنها دریافتند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونهٔ 21B، با تولید ترکیبات فنیل لاکتیک اسید و ۴-هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید، توانایی مهار رشد *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* را دارا می‌باشد. در مطالعهٔ خراسانچی و همکاران (۱۳۹۰) نیز ارزیابی فعالیت ضدقارچی پالیدهٔ کشت *لاکتوباسیلوس روتری* جداشده از خمیرترش نشان داد که از روز دوم به بعد تفاوت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) در میزان رشد *آسپرژیلوس نایجر* وجود داشت ولی در خمیرترش حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* این تفاوت کمتر بود. همچنین میزان رشد *آسپرژیلوس نایجر* در محیط کنترل به‌طور معنی‌داری بیشتر از محیط‌های تهیه‌شده از مایع رویی خمیرترش حاوی این جدایه‌ها بود. اگرچه عموماً متابولیت‌های ثانویهٔ باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای اثرات ضدقارچی بیشتری هستند اما ممکن است بعضاً متابولیت‌های اولیه با خاصیت ضدقارچی مؤثرتری تولید گردند و یا برخی از متابولیت‌های تولیدی در تروفوفاز[2] یا آیدیوفاز[3] روی یکدیگر اثر هم‌افزایی داشته باشند و یا حتی نوع متابولیت‌های تولیدی در هر فاز رشد روی یک قارچ خاص مؤثرتر باشند (همانند آنچه در نتایج این مطالعه درخصوص تأثیر متابولیت‌های فازهای مختلف رشد دو جدایهٔ لاکتیکی روی شاخص‌های قارچی مشاهده گردید).

صادقی و همکاران (۱۳۹۵) نیز با بررسی خاصیت ضدقارچی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس برویس* جداشده از خمیرترش آرد کامل گندم در برابر *آسپرژیلوس فلاووس* دریافتند که اختلاف معنی‌داری بین میزان بازدارندگی این جدایه‌ها از روز اول تا روز ۶ بر رشد کپک وجود نداشت. Abbaszadeh و همکاران (۲۰۱۵) نیز فعالیت ضدقارچی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*[4] و پالیدهٔ کشت آنها را در برابر *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*[5] ارزیابی کرده و دریافتند که فعالیت ضدقارچی پالیدهٔ کشت این جدایه‌ها از کشت مایع آنها کمتر بود. همچنین از بین جدایه‌های یادشده بیشترین اثر ضدقارچی را *لاکتوباسیلوس کازئی* و کمترین اثر را *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* داشت و اثر بازدارندگی این جدایه‌های لاکتیکی روی *آسپرژیلوس فلاووس* نسبت به سایر قارچ‌ها بیشتر بود. Magnusson و همکاران (۲۰۰۳) نیز با بررسی تأثیر بازدارندگی تعداد زیادی از *لاکتوباسیلوس‌های* جداشده در برابر انواعی از *آسپرژیلوس‌ها* و *پنیسیلیوم‌ها* دریافتند که فعالیت ضدقارچی این باکتری‌های اسیدلاکتیک در pH=۳-۴/۵ پایدارتر و بیشترین مقدار بوده است. به‌طورکلّی فعالیت ضدقارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک باتوجه‌به نژاد و گونهٔ آنها بسیار متفاوت می‌باشد. علاوه‌بر این، عوامل متعددی بر میزان تأثیرگذاری ترکیبات ضدقارچی تولیدشده توسط این باکتری‌ها مؤثر بوده و اثر متقابل اسیدهای آلی با سایر ترکیبات دارای اثر ضدقارچی نیز در این مورد اهمیت دارند (Gerez *et al.*, 2009; Sangmanee & Hongpattarakere, 2014).

نتیجه‌گیری

فساد قارچی، ضرر اقتصادی زیادی در محصولات نانوایی به‌جا می‌گذارد. این فسادها همچنین منبع اصلی تولید مایکوتوکسین‌ها هستند که برای سلامت انسان مضر می‌باشند. در سال‌های اخیر، استفاده از میکروارگانیسم‌ها و یا متابولیت‌های آنها با هدف جلوگیری از فساد قارچی و افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی جهت بهره‌مندی از خصوصیت بازدارندگی زیستی آنها مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است. براساس نتایج این پژوهش، جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش‌های سبوس برنج و سبوس گندم و همچنین پالیدهٔ کشت آنها از قابلیت ضدقارچی مناسبی بر علیه *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* برخوردار بودند که براین‌اساس می‌توان از آنها به‌عنوان کشت آغازگر و یا کشت همراه در فراوری

[1] Trophophase
[2] Trophophase
[3] Idiophase
[4] *Bifidobacterium bifidum*
[5] *Aspergillus parasiticus*

محصولات تخمیری نظیر خمیرترش با هدف کاهش فسادهای قارچی استفاده نمود. ازسوی‌دیگر باتوجه‌به اینکه سبوس گندم و سبوس برنج، جزء دُورریزها یا محصولات جانبی صنایع آردسازی و شالیکوبی محسوب می‌شوند لذا استفاده از آنها در تهیهٔ خمیرترش می‌تواند به‌عنوان راهکاری جهت مصرف غذایی این دُورریزها در فراوری نان و همچنین استفادهٔ مناسب از ریزمغذی‌های موجود در آنها در پژوهش‌های آتی مطرح شود.

منابع

۱- ابراهیمی، م.، صادقی، ع.، و صادقی، ب. ۱۳۹۶. رابطهٔ فیلوژنتیکی و خصوصیات پروبیوتیکی جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو. میکروب‌شناسی مواد غذایی، ۴(۶): ۷۰-۵۷.

۲- خراسانچی، ن.، پیغمبردوست، ه.، گلشن‌تفتی، ا.، حجازی، م. و رأفت، ع. ۱۳۹۰. ارزیابی قابلیت خمیرترش مایع حاوی آغازگرهای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس روتری* در جلوگیری از فساد قارچی نان. پژوهش‌های صنایع غذایی، ۲۱(۳): ۴۰۰-۳۹۱.

۳- خشایی، م.، صادقی، ع.، خمیری، م.، کاشانی‌نژاد، م. و صادقی ماهونک، ع. ۱۳۹۶. ارزیابی خواص ضدمیکروبی پدیوکوکوس *استیلسی* جداشده از خمیرترش آرد کامل جو. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۱۲(۳): ۹۸-۸۹.

۴- صادقی، ع.، ابراهیمی، م. و رئیسی، م. ۱۳۹۴. ارزیابی قابلیت *لاکتوباسیلوس‌های* جداشده از خمیرترش آرد کامل گندم در کاهش میزان آفلاتوکسین B1. میکروب‌شناسی مواد غذایی، ۶(۲): ۱۴-۱.

۵- صادقی، ع.، ابراهیمی، م. و صادقی، ب. ۱۳۹۵. تأثیر جدایه‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس برویس* بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* و کاهش آفلاتوکسین B1. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، ۱۵(۱): ۱۶-۳.

۶- کیا دلیری، ف.، صادقی، ع.، خمیری، م.، کاشانی‌نژاد، م. و اعلمی، م. ۱۳۹۶. ارزیابی خواص ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس برویس* جداشده از خمیرترش آرد کامل جو. مجله علوم و صنایع غذایی ایران، در نوبت چاپ.

7- AACC International. 2010. AACC methods 46-30. Approved methods of the american association of cereal chemists. 11th Ed. St. Paul, MN.

8- 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*. Journal de Mycologie Medicale, 25(4):263-267.

9- 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. The Journal of Nutrition, 139(11):2024-2031.

10- Axel, C., Brosnan, B., Zannini, E., Peyer, L.C., Furey, A., Coffey, A., & Arendt, E.K. 2016. Antifungal activities of three different Lactobacillus species and their production of antifungal carboxylic acids in wheat sourdough. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(4):1701-1711.

11- 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(2):539-545.

12- Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N., & Gobbetti, M. 2001. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *triticum durum* and *triticum aestivum*) sourdoughs of southern italy. International Journal of Food Microbiology, 64(1-2): 95-104.

13- De Vuyst, L., & Vancanneyt, M. 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. Food Microbiology, 24(2):120-127.

14- De Vuyst, L., & Neysens, P. 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. Trends in Food Science & Technology, 16(6-7):43-56.

15- Farahmand, E., Razavi, S.H., Yarmand, M.S., & Morovatpour, M. 2015. Development of iranian rice-bran sourdough breads: physicochemical, microbiological and sensorial characterisation during the storage period. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 7(3):295-303.

16- Ferchichi, M., Valcheva, R., Pervost, H., Onno, B., & Dousset, X. 2007. Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. Food Microbiology, 24(7-8):678-686.

17- Galvez, A., Abriouel, H., Lucas Lopez, R., & Ben Omar, N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. Food Microbiology, 120(1-2):51-70.

18- Gerez, C.L., Ines Torino, M.I., Rollan, G., & Font de Valdez, G. 2009. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. Food Control, 20:144-148.

19- Gulahmadov, S.G., Abdullaeva, N.F., Guseinova, N.F., Kuliev, A.A., Ivanova, I.V., Dalgalarondo, M., Chobert, J.M., & Haertlee, T. 2009. Isolation and characterization of bacteriocin-like inhibitory substances from lactic acid bacteria isolated from azerbaijan cheeses. Applied Biochemistry and Microbiology, 45(3):266-271.

20- Gupta, R., & 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.

21- Hassan, Y.I., & Bullerman, L.B. 2008. Antifungal activity of *lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. International Journal of Food Microbiology, 121(1):112-115.

22- Katina, K., Juvonen, R., Laitila, A., Flander, L., Nordlund, E., Kariluoto, S., Piironen, V., & Poutanen, K. 2012. Fermented wheat bran as a functional ingredient in baking. Cereal Chemistery, 89(2):126-134.

23- Katina, K., Arendt, E., Liukkonen, K.H., Autio Flander, L., & Poutanen, K. 2005. Potential of sourdough for healthier cereal products. Trends in Food Science and Technology, 16(1-3):104-112.

24- Kristensen, D.M., Wolf, Y.I., Mushegian, A.R., & Koonin, E.V. 2011. Computational methods for gene orthology inference. Briefings in Bioinformatics, 12(5):379-391.

25- Lavermicocca, P., Valerio, F., & Visconti, A. 2003. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. Applied and Environmental Microbiology, 69(1):634-640.

26- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., & Gobbetti, M. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *lactobacillus plantarum* strain 21b. Journal of Applied Microbiology, 66(9):4084-4090.

27- Magnusson, J., Strom, K., Roos, S., Sjogren, J., & Schnurer, J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters, 219(1):129-135.

28- Manini, F., Casiraghi, M.C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., & Plumed-Ferrer, C. 2015. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. Food Science and Technology, 66(3):275-283.

29- Meroth, C.B., Hammes, W.P., & Hertel, C. 2004. Characterisation of the microbiota of rice sourdoughs and description of *lactobacillus spicheri* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology, 27(2):151-159.

30- Poutanen, K., Flander, L., & Katina, K. 2009. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. Food Microbiology, 26(7):693-699.

31- Robert, H., Gabriel, V., & Fontagné-Faucher, C. 2009. Biodiversity of lactic acid bacteria in french wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. Food Microbiology, 135(1): 53-59.

32- Sadeghi, A., Raeisi, M., Ebrahimi, M., & Sadeghi, B. 2016. Antifungal activity of *pediococcus pentosaceus* isolated from whole barley sourdough. Journal of Food Quality and Hazards Control, 3(1):30-36.

33- Sangmanee, P., & Hongpattarakere, T. 2014. Inhibitory of multiple antifungal components produced by *lactobacillus plantarum K35* on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Food Control, 40:224-233.

34- Simsek, O., Hilmi Con, A., & Tulumoglu, S. 2006. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. Food Control, 17(4):263-270.

35- Varsha, K.K., Priya, S., Devendra, L., & Nampoothiri, K.M. 2014. Control of spoilage fungi by protective lactic acid bacteria displaying probiotic properties. Applied Biochemistry and Biotechnology, 172(7):3402-3413.

36- 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):1-7.

Isolation, Molecular Identification and Evaluation of Antifungal Effect of Dominant Lactic Acid Bacteria Isolated from Wheat Bran and Rice Bran Sourdoughs

Masoumeh Ehsanbakhsh[1], Alireza Sadeghi[2*], Mojtaba Raeisi[3], Maryam Ebrahimi[4], Mahdi Kashaninejad[5]

1- Former MSc Student of Food Biotechnology, Faculty of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2- Assistant Professor, Faculty of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
*Corresponding author (sadeghi.gau@gmail.com)
3- Assistant Professor, Cereal Health Research Center, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran
4- Former PhD Student of Food Microbiology, Faculty of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
5- Professor, Faculty of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

Sourdough is a proper fermented ecosystem for isolation of lactic acid bacteria (LAB) with antifungal effects. In this research, dominant LAB isolated from rice bran and wheat bran sourdoughs were identified based on molecular method. Antifungal activity of the isolates and their cell free culture filtrate (CCF) obtained from logarithmic and stationary phases were also investigated based on overlay and spore spot methods respectively, against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. According to sequencing the results of PCR products, *Lactobacillus paraplantarum* in wheat bran sourdough and *Pediococcus pentosaceus* in rice bran sourdough were identified as dominant isolated LAB. The results of overlay method also confirmed the inhibitory potential of the isolates against indicator fungi in comparison to control sample. Furthermore, inhibitory effect of the LAB isolates against *A. flavus* was significantly higher than the *A. niger* (P<0.05). The inhibitory effect of CCF obtained from each bacterium logarithmic and stationary phases against *A. flavus* were also significantly different but between inhibitory effect of *L. paraplantarum* stationary CCF and *P. pentosaceus* logarithmic CCF against this fungus, significant difference was not observed (P<0.05). The inhibitory effect of CCF obtained from the isolates logarithmic and stationary phases against *A. niger* were also not significantly different (P<0.05).

Keywords: Antifungal Effect, LAB Isolate, Rice and Wheat Bran Sourdough