مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

ارزیابی خصوصیات ضدمیکروبی و پروبیوتیکی باکتری اسید لاکتیک غالب جدا شده از تخمیر تصادفی بذر شبدر جوانه‌زده

مریم زارعلی[۱]، علیرضا صادقی[۲*]، سید مهدی جعفری[۳]، علیرضا صادقی ماهونک[۴]، مریم ابراهیمی[۵]

۱-دانشجوی دکتری زیست فناوری 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 مهندسی مواد و طراحی 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- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات سلامت فراورده‌های غذایی، دارویی و طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰ /۰۸/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۴

کلمات کلیدی:

شبدر جوانه‌زده،

ضدقارچی،

ضدمیکروبی،

پروبیوتیک.

DOI: 10.52547/fsct.19.123.299

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1

* مسئول مکاتبات:

Sadeghi.gau@gmail.com

چکیده

اخیرا تمایل به استفاده از کشت‌های آغازگر دارای قابلیت پروبیوتیکی از بین باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از بسترهای تخمیری غیر لبنی افزایش یافته است. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری اسید لاکتیک غالب جداشده از بذر شبدر جوانه‌زده تخمیرشده و همچنین ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی آن بود. این جدایه لاکتیکی بر اساس نتایج توالی‌یابی محصولات PCR، *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* شناسایی شد.اثر ضدقارچی و ضدباکتریایی جدایه مذکور به شکل معنی‌داری (P<۰/۰۵) در برابر *آسپرژیلوس نایجر* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به سایر عوامل قارچی و باکتریایی غذازاد مورد مطالعه بیشتر بود. علاوه براین، جدایه *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* از زنده‌مانی مناسبی (۷۷/۲۲ درصد) در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش برخوردار بود. این باکتری فاقد فعالیت همولیزی بود و میزان خوداتصالی آن نیز معادل ۳۵/۵۱ درصد به دست آمد. همچنین میزان دگر اتصالی جدایه مذکور با *اشرشیا کلی* و *سالمونلا اینتریکا* به ترتیب ۴۸/۷۱ و ۱۸/۴۳ درصد تعیین گردید. علاوه بر این، باکتری مذکور نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنیسیلین، سفالوتین، آمپیسیلین و سفازولین حساسیت نشان داد. بر این اساس، امکان استفاده از جدایه مذکور به عنوان یک کشت پروبیوتیک با قابلیت استفاده بالقوه به عنوان نگهدارنده زیستی در صنایع غذایی وجود دارد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]

[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

۱- مقدمه

امروزه در سرتاسر جهان به دلیل تولید حجم انبوه مواد غذایی و کم بودن مدت زمان نگهداری، گرایش به استفاده از ترکیبات مختلف جهت افزایش مدت نگهداری مواد غذایی افزایش یافته است. یکی از عوامل فساد مواد غذایی و کاهش مدت زمان نگهداری آنها، رشد میکروارگانیسم‌هایی نظیر باکتری‌ها، کپک‌ها و مخمرهای فاسد کننده، بیماری‌زا و یا متابولیت‌های آن‌ها بوده که مشکلات قابل توجهی را برای تولید کنندگان و مصرف کنندگان ایجاد می‌کنند. استفاده از نگهدارنده‌های سنتزی یکی از راه‌های مقابله با این مشکل بوده ولی در تحقیقات زیادی به اثرات نامطلوب این ترکیبات بر سلامتی مصرف کنندگان از جمله سرطانزایی، جهش‌های ژنی و اختلالات روانی مختلف اشاره شده است [۱]. بنابراین، صنعت غذا به دنبال جایگزین کردن نگهدارنده‌های طبیعی و ایمن به جای انواع سنتزی آنها با هدف افزایش زمان نگهداری و افزایش سلامت مصرف کنندگان می‌باشد [۳,۲].باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های ضدمیکروبی آنها عمده‌ترین نگهدارنده‌های زیستی هستند که در صنایع غذایی و دارویی کاربرد داشته و شامل ترکیباتی نظیر CO_2، H_2O_2، دی استیل، استالدهید، ایزومرهای آمینواسیدها، روتئین، باکتریوسین‌ها و ترکیبات شبه باکتریوسینی می‌باشند [۵,٤].

بسترهای غذایی تخمیری منابع غنی ازمیکروارگانیسم‌های مفیدی بوده که با جداسازی این میکروارگانیسم‌ها و استفاده از آنها به عنوان کشت آغازگر در تولید محصولات غذایی، موجب بهبود خصوصیات عملکردی و همچنین افزایش سطح کیفیت فرآورده‌های غذایی می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها عمدتا شامل مخمرها و باکتری‌های اسید لاکتیک بوده که در تحقیقات زیادی به جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های مذکور و استفاده از آنها به عنوان کشت آغازگر پرداخته شده‌است [٦]. به عنوان مثال، Rizzelloو همکاران (۲۰۱۱) با بررسی خاصیت ضدقارچی عصاره‌های آبی و متانولی جوانه گندم تخمیرشده با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[1] و *لاکتوباسیلوس روسیا*[2] بر روی کپک *پنیسلیوم روکوفورتی*[3] بیان کردند که عصاره آبی، قابلیت ممانعت از رشد قارچ‌های جداشده از محصولات نانوایی را داشت[۷]. در مطالعه Lan و همکاران (۲۰۱۲) از بین ۸۵ جدایه لاکتیکی تنها دو جدایه *ویسلا پارامزنتریودس*[4]و *ویسلا سیبریا*[5]خاصیت بازدارنگی قابل توجهی بر روی رشد قارچ‌های *پنیسلیوم اکسالیکوم*[6]، *آسپرژیلوس فلاووس*[7]، *آسپرژیلوس سایدووی*[8]و *موکور راسموسوس*[9] از خود نشان دادند [۸].

بر اساس تعریف سازمان بهداشت جهانی، پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف در مقدار مناسب و زنده‌مانی در شرایط نامساعد دستگاه گوارش، منجر به حفظ فلور میکروبی روده، محافظت از دستگاه گوارش در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای معده‌ای-روده‌ای و کاهش سرطان می‌شوند [۹,۱۰]. عموما برخی از مخمرها و باکتری‌ها به عنوان سویه پروبیوتیک در نظر گرفته می‌شوند که شامل مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*[10]واریته بولاردی، برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک نظیر گونه‌هایی از *لاکتوباسیلوس*، *استرپتوکوکوس و انتروکووس*، *بیفیدوباکتریوم*، *پروپیونی باکتریوم* وحتی انواعی از باکتری‌هایغیر اسید لاکتیک نظیر *باسیلوس سوبتیلیس*[11] و *اشرشیا کلی*[12] می‌باشند [۱۱]. علاوه بر دسترسی به سویه‌های پروبیوتیک تجاری در سراسر جهان، شناسایی سویه-های جدید از جنس‌های مختلف نیز در مطالعات زیادی صورت گرفته است [۱۲,۱۳].

به منظور انتخاب سویه‌های پروبیوتیک، چندین ویژگی از جمله تحمل شرایط دستگاه گوارش (اسید و صفرا)، توانایی اتصال به غشای مخاطی و رقابت به منظور حذف باکتری‌های بیماری‌زا باید مورد بررسی قرار گیرد [١٤]. علاوه براین، ایمن بودن پروبیوتیک‌ها یک مساله اولیه قبل از استفاده آنها جهت مصارف انسانی و همچنین کشت آغازگر بوده که در بحث ایمنی آنها، معمولا خصوصیاتی نظیر عدم انتقال ژن‌های مقاومت به

1. *Lactobacillus plantarum*
2. *Lactobacillus rossiae*
3. *Penicillium roqueforti*
4. *Weissella paramesenteroides*
5. *Weissella cibaria*
6. *Penicillium oxalicum*
7. *Aspergillus flavus*
8. *Aspergillus sydowii*
9. *Mucor racemosus*
10. *Saccharomyces cervisiae*
11. *Bacillus subtilis*
12. *Eshesichia coli*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

آنتی‌بیوتیک‌ها، عدم تولید آمین‌های بیوژنیک و عدم همولیز خون مورد بررسی قرار می‌گیرند [۱۵].

بذر شبدر با نام علمی *Trifolium resupinatum* گیاهی است که در شرایط آب و هوایی مناطق مدیترانه، شمال غربی آمریکا و شرق آفریقا رشد می‌کند. این گیاه به دلیل خاصیت ضدعفونی کنندگی و فعالیت ضداکسایشی به عنوان یک گیاه دارویی مورد استفاده قرار گرفته و جوانه آن نیز به شکل خام و در سالادها مصرف می‌شود [۱۷,۱۶].

در مطالعات اخیر بر روی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از بسترهای تخمیری، ویژگی‌های پروبیوتیکی مناسبی نظیر مقاومت به اسید و نمک‌های صفراوی، فعالیت ضدباکتریایی و قابلیت خود-اتصالی گزارش شده‌است. به عنوان مثال، در مطالعه‌ای خواص پروبیوتیکی و فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده از سبوس گندم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس*[۱۳] جداشده دارای فعالیت ضدقارچی در مقابل *آسپرژیلوس نایجر*[۱۴] و *آسپرژیلوس اوریزا*[۱۵] و فعالیت ضدباکتریایی بر علیه *لیستریا مونوسیتوژنز*[۱۶] بودند [۱۸]. در پژوهش حاجی نیا و همکاران (۱۳۹۹) خاصیت پروبیوتیکی و ضدمیکروبی باکتری اسید لاکتیک جداشده از جو دوسر تخمیرشده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این جدایه از قابلیت مناسبی برای استفاده به عنوان کشت پروبیوتیک و یا نگهدارنده در صنایع تخمیری برخوردار می‌باشد [۱۹]. در ارزیابی Lavenil و همکارانش (۲۰۱۶) تاثیر شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش بر روی زنده‌مانی جدایه *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شد که سویه مذکور از زنده‌مانی مناسبی (۶۱/۲۰ درصد) برخوردار بود [۲۰]. مطالعه دیگری نیز نشان داد که باکتری اسید لاکتیک جداشده از هوره، قابلیت زنده‌مانی مناسبی در شرایط اسیدی و در حضور نمک‌های صفراوی داشت [۲۱].درپژوهش Sakandar و همکاران (۲۰۱۸) باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده از خمیرترش، خاصیت خود-اتصالی متفاوتی از خود نشان دادند و در بین آنها *انتروکوکوس فکالیس*[۱۷] *انتروکوکوس فکالیس*[۱۷] بالاترین خاصیت خود-اتصالی را دارا بود [۲۲]. در مطالعه Shirvani و همکاران (۲۰۱۶)، پژوهشگران به ارزیابی خصوصیات شیمیایی و آنتی‌اکسیدانی بذر شبدر جوانه‌زده پرداخته و مشاهده نمودند که در طی جوانه‌زنی میزان برخی ترکیبات شیمیایی بسترهای تخمیری کاهش و برخی دیگر افزایش یافت. همچنین محققین مذکور بیان نمودند که محتوای فنولی در طی این فرآیند افزایش یافته و با افزایش مدت جوانه‌زنی خاصیت مهار رایکال DPPH[۱۸] نیز افزایش قابل توجهی از خود نشان داد [۲۳].

تاکنون از آرد بذر شبدر جوانه‌زده به عنوان بستر تخمیری جهت جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک استفاده نشده‌است. لذا هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری اسید لاکتیک حاصل از تخمیر تصادفی بذر شبدر جوانه‌زده و ارزیابی خصوصیات ضدقارچی و پروبیوتیکی جدایه مذکور بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه وکشت میکروبی

بذر شبدر مورد استفاده در این مطالعه از شهرستان بروجرد خریداری و به آزمایشگاه شیمی دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردید. عوامل میکروبی غذازاد مورد استفاده در این مطالعه که شامل *اشرشیا کلی*(PTCC 1399)، *استافیلوکوکوساورئوس*[۱۹] (PTCC 1112)، *باسیلوس سرئوس*[۲۰](PTCC 1015)، *سالمونلا انتریکا*[۲۱] (PTCC 1709) و *آسپرژیلوس نایجر* (PTCC 5012) بوده که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST, Iran) خریداری گردیدند. مواد شیمیایی و محیط-های کشت میکروبی نیز از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

۲-۲- جوانه‌زنی بذر شبدر

فرآیند جوانه‌زنی بذر شبدر به مدت سه روز و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام شد. سپس شبدر جوانه‌زده در آون با دمای

13. *Pediococcus pentosaceus*
14. *Aspergillus niger*
15. *Aspergillus oryzae*
16. *Listeria monocytogenes*
17. *Enterococcus fecalis*
18. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
19. *Staphylococcus aureus*
20. *Bacillus cereus*
21. *Salmonella enterica*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

۵۵ درجه سلسیوس خشک و توسط آسیاب (آسان توس شرق، ایران) به آرد تبدیل گردید. خصوصیات شیمیایی آرد شبدر جوانه‌زده از جمله مقادیر خاکستر، پروتئین، چربی نیز بر اساس روش‌های استاندارد تعیین شد [۲٤].

۲-۲-۱-اندازه‌گیری خاکستر آرد بذر شبدر جوانه‌زده

به منظور تعیین میزان خاکستر آرد بذر شبدر جوانه‌زده پس از حرارت دادن بوته‌های چینی در کوره الکتریکی (دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه) و سرد شدن آن، ۵ گرم از این آرد در بوته‌های چینی تا شعله ور شدن حراررت دید. در مرحله بعد بوته‌ها در کوره الکتریکی با دمای ۵۰۰ تا ٦۰۰ درجه سلسیوس به مدن ٤-٦ ساعت قرار گرفت و خاکستر ذرات سفید رنگ بدون ذرات سیاه به دست آمد. در پایان بوته‌ها در دسیکاتور قرار گرفت و سرد شد و پس از وزن کردن درصد خاکستر بر اساس معادله (۱) محاسبه شد [۲٤].

$$Ash\%=(A-B) / M \times 100$$

در رابطه بالاAsh میزان خاکستر نمونه، A وزن نمونه و ظرف قبل از قرار دادن در کورهبرحسب گرم، B وزن نمونه و ظرف بعد از قرار گرفتن در کورهبرحسب گرم، M وزن نمونه برحسب گرم می‌باشد.

۲-۲-۲-اندازه‌گیری پروتئین آرد بذر شبدر جوانه‌زده

بدین منظور ابتدا آرد بذر شبدر جوانه‌زده در داخل بالن‌های هضم کلدال توسط اسید سولفوریک غلیظ و یک عدد قرص کاتالیزور هضم شد. عملیات هضم به مدت ۱٤۰ دقیقه تا شفاف شدن محلول به منظور تکمیل شکسته شدن ترکیبات آلی، ادامه یافت. بعد از سرد و خارج شدن بخارات اسیدی، مرحله تقطیر با استفاده از سود ۳۲ درصد و اسید بوریک ۲ درصد انجام گرفت. در انتها، در مرحله تیتراسیون، آنیون بورات که متناسب با مقدار ازت موجود در نمونه است با اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال در حضور معرف متیل رد، تیتر و درصد ازت کل بر اساس معادله (۲) محاسبه گردید [۲٤].

$$\text{Nitrogen\%} = \frac{(V2 - V1)}{M} \times N \times 14 \times 100$$

در رابطه بالا Nitrogen میزان ازت کل نمونه، N= نرمالیته اسید کلریدریک، V_2 میلی‌لیتر اسید مصرف شده برای نمونه، V_1 میلی‌لیتر اسید مصرف شده برای شاهد، M وزن نمونه بر حسب گرم می‌باشد. برای به دست آوردن درصد پروتئین نمونه‌ها، میزان ازت در فاکتور ۵/۷ ضرب و میزان پروتئین بر حسب ماده خشک محاسبه گردید.

۲-۲-۳-اندازه‌گیری چربی آرد بذر شبدر جوانه‌زده

مقدار چربی خام بعد از هیدرولیز نمونه توسط اسید کلریدریک و تبخیر شدن استرهای باقی مانده از معادله (۳) محاسبه گردید [۲٤].

$$Fat\%=M_f/ M \times 100$$

در رابطه بالا Fat میزان چربی، M_f وزن چربی بر حسب گرم، M وزن نمونه برحسب گرم می‌باشد.

۲-۳-تخمیر تصادفی شبدر جوانه‌زده

جهت تخمیر تصادفی (بدون کشت آغازگر) ابتدا آرد شبدر جوانه‌زده با راندمان خمیر (نسبت خمیر به آرد × ۱۰۰) برابر ۱٦۰، با آب مقطر استریل و در شرایط و ظروف استریل، مخلوط و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. فرآیند مایه‌گیری (افزودن ۱۰ درصد خمیرترش روز قبل به خمیر تازه) تا ۳ روز و ثابت شدن اسیدیته بستره تخمیری ادامه پیدا کرد [۲۵].

۲-٤- جداسازی و شناسایی باکتری اسید لاکتیک غالب

به منظور جداسازی جدایه لاکتیکی از آخرین مایه‌گیری بستر تخمیری، رقت‌سازی متوالی ده‌دهی تهیه و بر روی محیط کشت MRS[22]آگار کشت سطحی داده شد. سپس از کلنی‌های باکتری-های رشد کرده، کشت خطی تهیه و در انتها تک پرگنه‌های خالص با استفاده از آزمون‌های کاتالاز و رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه، جهت شناسایی جدایه لاکتیکی، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج (Bioneer, AccuPrep K-3032, South Korea) صورت گرفت و توسط PCR (Polymerase chain reaction) با پرایمرهای F44 و R1543 طی ۳۰ چرخه حرارتی شامل واسرشت (۹٤ درجه سلسیوس به مدت ٤۵ ثانیه)، اتصال پرایمر (۵٤ درجه سلسیوس به مدت ٤۵ ثانیه)، و توسعه محصول (۷۲ درجه سلسیوس به مدت ٦۰ ثانیه) تکثیر یافته و پس از الکتروفورز در

22. De Man, Rogosa and Sharpe agar

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

ژل آگارز ۱/۵ درصد، محصولات PCR (توالی ۱۵۰۰ جفت بازی از جایگاه 16S rDNA) توالی‌یابی (Bioneer, South Korea) گردید [۲۶].

۲-۵- اثر ضدقارچی جدایه لاکتیکی

جهت بررسی اثر ضدقارچی جدایه لاکتیکی حاصل از شبدر جوانه‌زده تخمیرشده از روش کشت دولایه استفاده گردید. بدین منظور، ابتدا پلیت‌های حاوی محیط کشت MRSآگار تهیه و ۳ میکرولیتر از کشت فعال جدایه لاکتیکی در مرکز این پلیت‌ها لکه‌گذاری شد. سپس پلیت‌های مذکور به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند. در ادامه، مخلوط حاوی یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور *آسپرژیلوس نایجر* با تعداد 10^5 spores/mL با ۹ میلی‌لیتر محیط PDA[23] آگار بر روی جدایه لاکتیکی کشت داده‌شده به صورت کشت دو لایه ریخته و پس از انعقاد لایه دوم، پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند. قطر هاله عدم رشد قارچ در اطراف کشت جدایه لاکتیکی نیز با نرم افزار image J نسخه (1.42e) تعیین گردید [۲۷].

۲-۶- ارزیابی اثر ضدباکتریایی جدایه لاکتیکی

برای بررسی اثر بازدارنده جدایه لاکتیکی در برابر باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* و *سالمونلا انتریکا* از روش لکه‌گذاری استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۳ میکرولیتر از جدایه لاکتیکی (کشت ۲۴ ساعته) بر روی محیط کشت MRS آگار ریخته و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. سپس محیط کشت BHI[24] آگار (۰/۸ درصد) حاوی جمعیت 10^5 CFU/mL از هر باکتری بیماری‌زا بر روی کشت قبلی ریخته شد و پس از جامد شدن لایه دوم، پلیت‌ها در دمای۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند [۲۸].

۲-۷- زنده‌مانی جدایه لاکتیکی در شرایط شبیه-سازی شده دستگاه گوارش

بدین منظور کشت دو بار فعال‌شده جدایه لاکتیکی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس توسط سانتریفیوژ یخچالدار (Sigma، آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوسو با دور g ٦٠٠٠ سانتریفیوژ گردید. سپس روماند آن دور ریخته و رسوب باقیمانده در بافر فسفات (pH=۷/٤) حل گردید و جذب نوری آن در طول موج nm ٦٠٠ توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر (PGI، انگلستان) حدود ۰/۱۰۸ تنظیم شد. در ادامه، pH سوسپانسیون باکتریایی توسط اسید کلریدریک ۱ نرمال، به ۲ رسیده و آنزیم پپسین با غلظت ۰/۳ درصد به مخلوط اضافه و در دمای۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱/۵ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. در ادامه pH این سوسپانسیون توسط سود ۱ نرمال، تا ٦/٥ افزایش یافت و در مجاورت نمک صفراوی با غلظت ۰/۳ درصد قرار گرفته و سپس در دمای۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱/۵ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از سپری شدن زمان مذکور از سوسپانسیون باکتریایی رقت‌سازی متوالی و کشت سطحی بر روی محیط کشت MRS آگار صورت گرفته و تعدادکلنی‌های رشد کرده بعد از ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، شمارش و نسبت به نمونه شاهد (کشت باکتری بدون اعمال تیمارهای مذکور) درصد زنده‌مانی محاسبه شد [۲۹].

۲-۸- ارزیابی قابلیت‌های خود-اتصالی و دگر-اتصالی جدایه لاکتیکی

برای ارزیابی خاصیت خود-اتصالی جدایه لاکتیکی، سلول‌های حاصل از کشت ۲٤ ساعته آن توسط سانتریفیوژ یخچالدار (۱۰ دقیقه، دمای ٤ درجه سلسیوس،دور g ٦٠٠٠)، جدا و طی دو مرحله با بافر فسفات (pH=۷/۲) شستشو داده شدند. سپس پالیده کشت باکتریایی در بافر فسفات، حل گردید به طوری که سوسپانسیون به دست آمده، جذبی معادل OD_{600}=۰/۱۰۸ داشت. در ادامه، سوسپانسیون باکتریایی به مدت ٤ و ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. در پایان زمان مذکور، جذب سوسپانسیون جدایه لاکتیکی در ٦٠٠ نانومتر خوانده شد و مطابق معادله (٤)، میزان خود-اتصالی محاسبه گردید. در این رابطه، A_0 و A به ترتیب، میزان جذب سوسپانسیون در ابتدا و انتهای گرمخانه‌گذاری هستند [۳۰].

$$\text{Autoaggregatation\%} = \left[1 - \left(\frac{At}{A0}\right)\right] \times 100$$

23. Potato Dextrose Agar
24. Brain Heart Infusion

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

همچنین جهت محاسبه قابلیت دگر-اتصالی جدایه لاکتیکی با باکتری‌های بیماری‌زا، از جدایه لاکتیکی و باکتری‌های بیماری‌زا، سوسپانسیونی با جذب OD_{600}=۰/۱۰۸ به صورت مجزا تهیه گردید. سپس مخلوطی با حجم‌های مساوی از سوسپانسیون هرکدام از باکتری‌های بیماری‌زا و جدایه لاکتیکی تهیه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٤ ساعت نگهداری گردید. متعاقبا جذب سوسپانسیون‌های مذکور در ٦۰۰ نانومتر خوانده شد و مطابق معادله (۵) میزان خاصیت تجمعی محاسبه گردید. در این رابطه A_P برابر با جذب سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا، A_{lac} جذب سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و A_{mix} جذب مخلوط سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و باکتری بیماری‌زا پس از ٤ ساعت می‌باشند [۳۱].

$$\text{Coaggregation}\,\% = \left(1 - \frac{Amix}{\frac{Alac + Ap}{2}}\right) \times 100$$

۲-۹- ارزیابی خاصیت آبگریزی جدایه لاکتیکی

به منظور ارزیابی خاصیت آبگریزی، سلول‌های حاصل از کشت ۲٤ ساعته جدایه لاکتیکی توسط سانتریفیوژ یخچالدار (به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس و دور ۱۰۰۰۰g) جدا و طی دو مرحله با بافر فسفات (pH=۷/۲) شستشو داده شدند. سپس پالیده کشت باکتریایی در بافر فسفات، حل گردید به طوری که سوسپانسیون به دست آمده، جذبی معادل OD_{600}=۰/۱۰۸ داشت. در ادامه، حجم مساوی از سوسپانسیون باکتریایی و زایلن به مدت ٤ دقیقه مخلوط گردید. بعد از مدت ۱ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، جذب فاز آبی در طول موج ٦۰۰ نانومتر خوانده شد و مطابق معادله (٦)، میزان آبگریزی سطحی محاسبه گردید. در این رابطه، A_0 و A به ترتیب، میزان جذب سوسپانسیون در ابتدا و انتهای گرمخانه-گذاری هستند [۳۲].

$$\text{Hydrophobicity}\,\% = \frac{A0 - A}{A} \times 100$$

۲-۱۰- ارزیابی مقاومت به آنتی‌بیوتیک

بدین منظور ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از کشت ۲٤ ساعته جدایه لاکتیکی به ٤ میلی‌لیتر محیط کشت MRS آگار یک درصد اضافه گردید. سپس مخلوط مذکور، درون پلیت ریخته شد. در مرحله بعد دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شامل پنیسیلین، سفالوتین، استرپتومایسین، آمپیسیلین، جنتامایسین، سیپروفلاکساسین، ایمی-پنم سفازولین، کلیندامایسین، سفتریاکسون، نالیدیکسیک اسید، نووبیوسین و ونکومایسین (پادتن طب، ایران) در مرکز سطح هر پلیت قرار داده شدند. پس از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها اندازه گیری شده و به صورت مقاوم (قطر کمتر یا مساوی۱٤ میلی‌متر)، حساسیت نسبی (قطر۱۵ تا ۱۹ میلی‌متر) و حساس (قطر بیش از ۲۰ میلی‌متر) گزارش گردید [۳۳].

۲-۱۱- ارزیابی قابلیت همولیز خون توسط جدایه لاکتیکی

برای این منظور، ابتدا جدایه لاکتیکی بر روی محیط کشت بلاد آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفند، کشت داده شد و پس از ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس، ایجاد هاله و تغییر رنگ در محیط کشت بررسی شد[۳٤].

۲-۱۲- آنالیز آماری

تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه[25] با مقایسه زوجی حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل گردیدند. برای آنالیز آماری و ترسیم نمودارها نیز به ترتیب، نرم افزارهای SPSS نسخه (۲٦) و Excel نسخه (۲۰۱۰) مورد استفاده قرار گرفتند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین خصوصیات شیمیایی بذر شبدر جوانه‌زده

بر طبق نتایج این پژوهش مشخص گردید که آرد شبدر جوانه‌زده حاوی ۱۹/۲۳ درصد پروتئین، ٤/۰۱ درصد چربی، ۵۰/۸٤ درصد کربوهیدرات و ۸/٦۹ درصد خاکستر بود. یکسری از محققین در بررسی خود روی ارزیابی خصوصیات شبدر جوانه‌زده مشاهده نمودند که محتویات دانه شبدر بعد از جوانه‌زنی شامل ۳۸/۱۰

25. One Way ANOVA

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

درصد پروتئین، ٤/٥٠ درصد چربی، ۳۷/۹۰ درصد کربوهیدرات و ۷/۲۰ درصد خاکستر بود. همچنین نتایج این محققین نشان داد که با افزایش مدت زمان جوانه‌زنی مقدار خاکستر و پروتئین افزایش و مقدار چربی و کربوهیدرات کاهش یافت [۲۳]. Fouad و همکاران (۲۰۱۵)در مطالعه خود به ارزیابی تاثیر جوانه‌زنی بر محتویات دانه عدس پرداخته و مشاهده نمودند که جوانه‌زنی سبب افزایش خاکستر دانه‌ها در طی ٦ روز جوانه‌زنی گردید [۳۵]. در مطالعه دیگری پژوهشگران مشاهده کردند که میزان پروتئین در دانه سویا خام ۲۹ درصد بوده در حالی که با جوانه-زنی میزان آن به ۳۵ درصد افزایش یافت [۳٦]. جوانه‌زنی فرآیندی است که طی آن دانه وارد مرحله جدیدی از رشد خود شده که با تقسیم سلولی و تولید یکسری آنزیم‌ها همراه است. معمولا دانه–ها برای تقسیم سلولی به انرژی نیاز داشته که آن را از محتویات درون خود تامین می‌کنند. کربوهیدرات‌ها از جمله این منابع تامین کننده انرژی بوده که با تولید آنزیم آلفا آمیلاز در دانه‌های جوانه‌زده کربوهیدرات‌ها را تجزیه و سبب کاهش یافتن محتویات کربوهیدراتی می‌گردند [۳۷]. چربی‌ها نیز منابع دیگر تامین کننده انرژی و کربن در دانه‌های جوانه‌زده هستند. در واقع اسیدهای چرب با تجزیه شدن به آب و دی اکسید کربن انرژی تولید کرده که این پدیده منجر به کاهش در میزان چربی دانه‌های جوانه‌زده می‌گردند [۲۳]. پروتئین‌ها نیز ترکیباتی هستند که در طی جوانه‌زنی میزانشان تغییر کرده و براساس مطالعات صورت گرفته می‌توان دلیل این امر را به ساخت آنزیم‌های پروتئینی و تغییرات شیمیایی در نتیجه تجزیه‌شدن ترکیبات سازنده بیان کرد [۳۸].

۳-۲- جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری اسید لاکتیک غالب

طی سه روز متوالی تکرار فرآیند مایه‌گیری از تخمیر تصادفی بذر شبدر جوانه‌زده، باکتری اسید لاکتیک غالب جداسازی شد که گرم مثبت و کاتالاز منفی بود. در این شرایط pH به ۳/۹۷ و اسیدیته قابل تیتر نیز به ٦/۳ رسید. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود تکثیر توالی هدف ۱۵۰۰ جفت بازی در جدایه لاکتیکی غالب مورد تایید قرار گرفت. مقایسه توالی به دست آمده با توالی‌های داده موجود در پایگاه داده NCBI[26] منجر به شناسایی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* ZFGC02 با تشابه ۹۷ درصد شد. پژوهشگران متعددی در گزارش‌های خود به حضور باکتری *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در منابع تخمیری بسیار زیادی از جمله غلات تخمیر شده اشاره کرده‌اند [٤۰,۳۹].

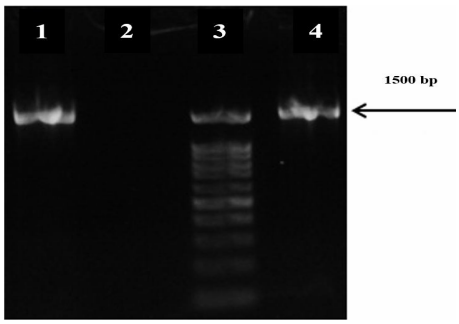

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of the PCR products with 1500 bp target sequence. Lane 1: amplified DNA of the selected predominant LAB isolate; lane 2: negative control (non DNA); lane 3: 100 bp DNA ladder and lane 4: positive control (amplified DNA of an identified strain).

در مطالعه Sáez و همکاران (۲۰۱۸)، محققین با بررسی فلور میکروبی آرد نخود تخمیر شده، *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* را به عنوان یکی از باکتری‌های غالب جداشده از این بستر معرفی نمودند [٤۱]. در طی فرآیند تخمیر، عواملی نظیر دما و زمان تخمیر، رقابت در جذب مواد غذایی و اسیدیته محیط، تنوع فلور میکروبی بستر را تحت تاثیر قرار می‌دهند. در واقع میکروارگانیسم‌های موجود در بستر تخمیری که به اسید، حساس هستند از بین رفته و میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید زنده می‌مانند. در تخمیر تصادفی به دلیل رقابت بین میکروارگانیسم‌های آلوده کننده و باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در بستر برای استفاده از مواد مغذی، درصورت غلبه باکتری اسید لاکتیک در این رقابت می‌توان آن را به عنوان باکتری شاخصی جداسازی کرد که دارای ویژگی ضدمیکروبی نیز هست. بازدهی خمیر، یکی از عوامل مهم دیگری است که بر روی خصوصیات خمیرترش و غالب شدن باکتری اسید لاکتیک با

26. National Center for Biotechnology Information

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

ویژگی‌های اختصاصی تاثیر می‌گذارد. هرچه میزان بازدهی خمیر، پایین‌تر باشد به دلیل کاهش فعالیت آبی و کاهش نرخ اسیدی شدن بستر، شرایط برای رشد قارچ‌ها فراهم‌تر شده و در نتیجه باکتری اسید لاکتیکی که از آن بستر جداسازی شود قابلیت رقابت با قارچ‌ها و همچنین خصوصیات ضدقارچی را دارا خواهد بود [٤٣,٤٢].

۳-۳- اثر ضدقارچی جدایه لاکتیکی

بر اساس شکل ۲ اثر بازدارنده جدایه *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بر قارچ *آسپرژیلوس نایجر* تایید شد. بر این اساس، درصد بازدارندگی از رشد جدایه مذکور در برابر *آسپرژیلوس نایجر* معادل ٦/٩١ درصد بود.

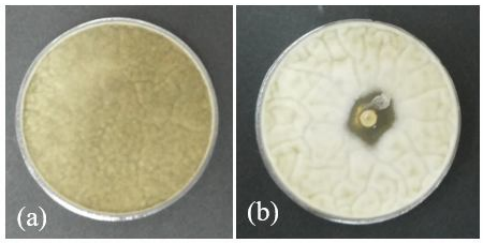

Fig 2 The antifungal activity of *Pediococcus pentosaceus* against*Aspergillus niger*(b) in comparison with control sample (a)

در پژوهش Jin و همکاران (۲۰۲۱) محققین از *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جداشده از بسترهای تخمیری به عنوان کشت آغازگر تخمیر نان استفاده کردند. همچنین در مطالعه مذکور اثر ضدقارچی این جدایه روی *آسپرژیلوس فلاووس* نیزمورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که منجر به تاخیر افتادن رشد کپک مذکور در نان‌های تولیدی گردید [٤٤].

Gerez و همکاران (۲۰۱۰) با مطالعه بر روی ۳۵ جدایه لاکتوباسیل و پدیوکوکوس، خصوصیات ضدقارچی آنها را بر روی *فوزاریوم گرامینروم*[27]، *آسپرژیلوس نایجر* وپنیسلیوم[28]به روش ممانعت از رشد سطحی قارچ بررسی کردند. نتایج پژوهش مذکور نشان داد که*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*بیشترین اثر مهارکنندگی را بر روی رشد قارچ‌های مورد بررسی داشت و کاربرد این باکتری به عنوان کشت آغازگر در محصول تولیدی نیز خاصیت ضدقارچی مطلوبی از خود نشان داد [٤٥]. Muhialdin و همکاران (۲۰۱۸) نیز در بررسی خود اثر ضدقارچی ۸۷۰ باکتری اسید لاکتیک جداشده از غذاهای تخمیری مالزیایی را طی دو مرحله بر روی قارچ‌های فاسد کننده محصولات نانوایی مورد بررسی قرار دادند. در ارزیابی اولیه آنها بر روی عمده‌ترین کپک آلوده کننده نان (*آسپرژیلوس نایجر*) تنها ٥٦ جدایه قادر به مهار رشد این قارچ بودند. در ارزیابی بعدی نیز که بر روی ۵ قارچ غذازاد دیگر شامل *آسپرژیلوس فلاووس*، *پنیسلیوم روکوفورتی*، *اروتیوم روبروم*[29]، *مونیلیاسیتوفیلا*[30] و *رایزوپوس نیگریکانس*[31] صورت گرفت تنها ١٦ جدایه خاصیت ضدقارچی خوبی از خود نشان دادند. همچنین در این مطالعه، میزان هاله عدم رشد قارچ‌های مذکور در برابر باکتری‌های اسید لاکتیک از ١٥/٦٦ تا ۸۰ میلی‌متر متفاوت بود [٤٦].

در دهه‌های اخیر به منظور انتخاب کشت آغازگر جهت استفاده در تخمیر خمیرترش، مطالعات زیادی صورت گرفته است. براساس پژوهش‌های مذکور، مشخص شد که برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک با خاصیت ضدقارچی مناسب، قابلیت استفاده در تخمیر خمیرترش و پخت نان را به منظور افزایش ماندگاری و کیفیت نان دارند. برخی محققین در پژوهشی بیان کردند که خاصیت ضدقارچی باکتری‌های اسید لاکتیک بستگی به نوع باکتری و جنس قارچ مورد مطالعه دارد [٤٧]. بر اساس تحقیقات صورت گرفته بیشتر جنس‌های لاکتوکوکوس و لاکتوباسیلوس و به میزان کمتر پدیوکوکوس و لوکونوستوک توانایی محدود کردن رشد قارچ‌های بیماری‌زا را دارند[٤٨]. اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دی استیل، اسیدهای چرب، رئوترین، دی پپتیدهای حلقوی، هیدروکسی اسیدهای چرب، فنیل استیک اسید، فنیل لاکتیک اسید، ترکیبات فنولی و سایر متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات ضدقارچی هستند که توسط این باکتری‌ها تولید می‌شوند [٥٠,٤٩]. از عوامل موثر بر تولید ترکیبات ضدقارچ توسط باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توان به دما و مدت زمان گرمخانه‌گذاری، محیط رشد، pH و عوامل تغذیه‌ای اشاره کرد [٥١,٥]. بر اساس مطالعات انجام شده علت بروز اثر ضدقارچی باکتری‌های اسید لاکتیک تحت تاثیر پدیده‌های پیچیده‌ای بوده که در این ویژگی نقش دارند. همچنین برخی از

27. *Fusarium graminearum*
28. Penicillium

29. *Eurotium rubrum*
30. *Monilia sitophila*
31. *Rhizopus nigricans*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

مکانیسم‌های موثر در فعالیت ضدقارچی از جمله تغییرات فراساختاری، تخریب DNA و تولید اکسیژن فعال هنوز ناشناخته باقی مانده است. در پژوهش‌های متعددی کاهش pH و برهم خوردن تعادل pH درون سلولی، ممانعت از فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز، اکسید شدن لیپیدهای غشایی، اکسید شدن پروتئین-های سلولی و نشت سیتوپلاسمی مهم‌ترین مکانیسم‌های موثر در خاصیت ضدقارچی باکتری‌های اسید لاکتیک گزارش شده است [۵۳,۵۲,۵].

۳-٤- ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی جدایه لاکتیکی

نتایج مربوط به بررسی خاصیت ضدباکتریایی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در جدول ۱ آمده است. همانطور که ملاحظه می‌گردد اثر بازدارنده جدایه مذکور بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* ۵٦/٦۱ میلی‌متر به شکل معنی‌داری ($P \leq 0.05$) نسبت به سایر باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد بیشتر بود. علاوه بر این، کمترین اثر بر روی *باسیلوس سرئوس* معادل ۳۳/۸۱ میلی‌متر مشاهده شد.

در پژوهشی که توسط Manini و همکاران (۲۰۱٦) انجام شد مشخص گردید که باکتری *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جدا شده از خمیرترش سبوس گندم نیز دارای اثر مهارکنندگی بر روی نژادهای مختلف لیستریا بود [۱۸]. محققین مذکوردلیل این خاصیت را به ترشح ترکیبات مختلف از جمله باکتریوسین‌ها و اسیدهای آلی ارتباط دادند. در مطالعه دیگری محققین به بررسی اثر ضدمیکروبی اگزوپلی‌ساکاریدهای جداشده از سویه پروبیوتیک *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* پرداخته و مشاهده نمودند که پلی‌ساکارید تولیدی دارای خاصیت ضدمیکروبی قابل توجهی بر روی *اشرشیا کلی* و همچنین سایر عوامل بیماری‌زای غذازاد از جمله *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفیموریوم*[۳۲] و *استافیلوکوکوس اورئوس* بود [٥٤].

خاصیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک به شکل قابل توجهی تحت تاثیر عوامل متعدد فیزیکی، شیمیایی، تغذیه‌ای و محیطی قرار دارد. در واقع فعالیتضدمیکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از بسترهای تخمیری به قابلیت آنها درکاهش دسترسی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زابه مواد مغذی و یا تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی مختلف ارتباط داشته که اسیدهای آلی همچون اسید استیک و اسید لاکتیک تولید شده در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، عمده‌ترین این ترکیبات می‌باشند. ازسایر متابولیت‌های دیگر ضدمیکروبی تولید شده توسط این باکتری‌ها می‌توان به اسید فرمیک، اسیدهای چرب آزاد، اتانول، پراکسید هیدروژن، دی استیل، استوئین، ۲-۳ بوتاندیول، استالدهید، بنزوات و باکتریوسین‌ها نیز اشاره کرد [۵۷-۵۵].

Table 1 Antibacterial activity of*Pediococcus pentosaceus* isolateagainst food-borne pathogens. The Results are average of three independent measurements, and represent the zone of growthinhibition (mm)

Zone of growth inhibition (mm)	Food-borne pathogens
56.61 ± 0.45^{a}	*Staphylococcus aureus*
33.81 ± 2.87^{c}	*Bacillus cereus*
36.02 ± 1.56^{bc}	*Escherichia coli*
44.22 ± 3.32^{b}	*Salmonella enterica*

The different letters show differences among the inhibitory effects on food- borne pathogen ($p < 0.05$).

۳-۵- زنده مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش

نتایج حاصل از بررسی زنده‌مانی جدایه لاکتیکی در شرایط شبیه-سازی شده دستگاه گوارش نشان داد که این باکتری به میزان ۷۷/۲۲ درصد زنده‌مانی خود را حفظ نمود.

Lavenil و همکاران (۲۰۱٦) به بررسی زنده‌مانی باکتری*پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جدا شده از تخمیر چاودار ایتالیایی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش پرداخته و مشاهده نمودند که این جدایه از زنده‌مانی خوبی در شرایط اسیدی و صفراوی برخوردار بود [۲۰]. حاجی نیا و همکاران (۱۳۹۹) در بررسی خود روی باکتری *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جداشده از جو دوسر تخمیرشده میزان زنده‌مانی این باکتری در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش را ۵۹/۸۰ درصد گزارش کردند [۱۹]. در بررسی Vasiee و همکاران (۲۰۱۸) که روی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جدا شده از هوره (مخلوط سبزی کارده، آرد گندم و دوغ تخمیرشده) انجام گرفت، مشخص گردید

[32] *Salmonella typhimurium*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

که این باکتری در pH=۲/۵ زنده‌مانی خوبی از خود نشان داد و مقاومت خوبی در غلظت‌های ۰/۰۶ و ۰/۱۲۵ درصد صفرا داشت [۲۱].

باکتری‌های پروبیوتیک برای ایجاد اثرات سودمند در بدن باید قادر به رشد در معده و روده بوده و توانایی اتصال به دیواره روده و سکونت در آن را نیز داشته باشند. بر اساس بررسی‌های انجام شده، اثر pH پایین معده، خاصیت ضدمیکروبی پپسین در بخش ابتدایی دستگاه گوارش و نمک‌های صفراوی ترشح شده در روده باریک عوامل کاهش دهنده زنده‌مانی باکتری‌های وارد شده به این محیط محسوب می‌شوند [۵۹,۵۸]. مقاومت بالای برخی از باکتری‌ها در شرایط اسیدی معده را می‌توان به تولید ترکیباتی نظیر اگزوپلی‌ساکاریدها نسبت داد که سبب محافظت از غشای سلولی در برابر اسید معده می‌شوند. محققین دیگری نیز در پژوهش خود بیان کردند که در تنش اسیدی، سلول‌های باکتریایی با تغییر در ساختار دیواره سلولی خود و با افزایش فعالیت پمپ ATPase، نفوذپذیری غشاء سلول را برای جذب H+ ورودی تغییر می‌دهند [۶۰]. بازسازی پروتئین‌های تغییر یافته و DNA آسیب دیده، تجزیه ترکیبات اسیدی محیط به وسیله آنزیم‌های دکربوکسیلاز را نیز مهم‌ترین پاسخ‌های باکتری‌های اسید لاکتیک نسبت به تنش اسیدی معرفی کرده‌اند [۶۱]. از سوی دیگر با ورود پروبیوتیک‌ها به محیط روده، املاح صفراوی با به هم ریختن ساختمان دیواره سلولی باعث مرگ این میکروارگانیسم‌ها می‌شوند.در واقع پروبیوتیک‌ها با تولید آنزیم‌های آبکافت کننده نمک‌های صفراوی، اثر آنها را خنثی کرده و سطح کلسترول سرم خون را پایین میآورند. بنابر این، مقاومت به نمک‌های صفراوی یکی از ضروری‌ترین ویژگی‌های پروبیوتیکی می‌باشد که زنده‌مانی و فعالیت آنها را در روده کوچک حفظ می‌نماید. بر اساس یافته‌های محققین، توانایی مقاومت و تحمل املاح صفراوی نه تنها به گونه باکتری بستگی دارد بلکه حتی در بین نژادهای مختلف یک گونه نیز کاملا متفاوت است [۶۲].

۳-۶- ارزیابی قابلیت خود-اتصالی و دگر-اتصالی جدایه لاکتیکی

بر اساس نتایج این پژوهش مشخص گردید که جدایه *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* دارای خاصیت خود-اتصالی ۳۵/۵۱ درصد و همچنین، خاصیت دگر-اتصالی ۷۱ /۴۸ درصد با باکتری *اشرشیا کلی* و ۱۸/۴۳ درصد با باکتری *سالمونلا انتریکا* بود.

در تحقیقی که بر روی ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده از خمیرترش صورت گرفت مشخص شد که باکتری‌های مذکور خاصیت خود-اتصالی متفاوتی ازخود نشان دادند و در بین آنها *انتروکوکوس فکالیس*بالاترین خاصیت خود-اتصالی را دارا بود [۲۲]. Sharma و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی خاصیت پروبیوتیکی باکتری‌های جداشده از یک بستر تخمیری مشاهده نمودند که *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی*[۳۳] دارای بیشترین خاصیت خود-اتصالی معادل ۴۱ درصد بوده که این مقدار تفاوت بسیار کمی با نتایج پژوهش حاضر داشت [۶۳].

قابلیت اتصال در باکتری‌ها به دو شکل خود-اتصالی (اتصال سویه‌های باکتریایی هم نوع) و دگر-اتصالی (اتصال سویه‌های باکتریایی متفاوت) مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. اتصال سویه‌های باکتریایی متفاوت منجر به واکنش پروبیوتیک‌ها با عوامل بیماری‌زا و همچنین ممانعت از لانه گزینی آنها در دستگاه گوارش می‌گردد. اتصال سویه‌های باکتریایی هم نوع نیز عموما موجب اتصال آنها به سلول‌های اپی‌تلیال روده، لانه گزینی و محافظت از آنها در شرایط دستگاه گوارش می‌شود [۶۴]. قابلیت اتصال باکتری‌های اسید لاکتیک به عوامل بیماری‌زا در پژوهش‌های مختلف به اجزای سطح سلولی آنها، تعاملات بین لکتین، کربوهیدرات و اجزای پروتئینی موجود در سطح سلولی نسبت داده شده، البته این مکانیسم هنوز نیازمند بررسی بیشتری است [۶۵].

طی پژوهش حاضر مشخص گردید که میزان قابلیت آبگریزی جدایه لاکتیکی در برابر زایلن ۷۲/۹۱ درصد بود در حالی که این مقدار چند برابر بیشتر از میزان آبگریزی سطحی باکتری اسید لاکتیک جداشده از اوجی در برابر زایلن یعنی ۳۴ درصد بود [۶۶]. محققین در پژوهش دیگری گزارش کردند که میزان آبگریزی در بین سویه‌های مختلف جداشده از محصولات

33. *Pediococcus acidilactici*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

تخمیری، متفاوت و در محدوده بین ۰/۸۶ تا ۹۸/۷۸ درصد بود [۶۷]. پژوهشگران در مطالعه دیگری میزان خاصیت آبگریزی سطحی سویه‌های لاکتوباسیل را بین ۸۲/۴۱ تا ۹۷/۹۶ درصد گزارش کردند [۶۸].

دیواره سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک حاوی مقادیر زیادی پپتیدوگلیکان، لیپوتئیکوئیک اسیدها، پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها می‌باشد. تفاوت در مقادیر نسبی این ترکیبات سطحی در سویه‌های مختلف اثر pH بر یونیزه شدن سطح را تحت تاثیر قرار می‌دهند. به طور کلی باکتری‌های اسید لاکتیک واجد مقادیر زیاد پروتئین‌های سطحی و لیپوتئیکوئیک اسیدها نسبت به جدایه‌هایی که دارای مقادیر زیادی از بخش‌های پلی‌ساکاریدهای هیدروفیلیک هستند آبگریزی بیشتری دارند [۶۹]. در منابع مختلفی به ارتباط بین خاصیت خود-اتصالی و آبگریزی سطحی اشاره شده‌است. زیاد بودن مقادیر خاصیت خود-اتصالی سبب افزایش خاصیت تجمعی باکتری‌های اسید لاکتیک در دستگاه گوارش می‌شود. آبگریزی قابلیتی رقابتی در اتصال باکتری‌های اسید لاکتیک است که سبب اتصال قوی این باکتری‌ها به ترکیبات غیر قطبی و بهبود تجمع آنها در سیستم ایمنی میزبان می‌شود. در واقع بسیاری از ویژگی‌های سطح سلولی باکتری‌ها عمدتا به آبگریزی سطحی بستگی دارند [۳۰]. نوع سویه و ماهیت هیدروکربن‌ها، عوامل اصلی هستند که درصد آبگریزی را تحت تاثیر قرار داده و شاخص آبگریزی بیشتر از ۷۰ درصد را به عنوان خاصیت آبگریزی بالا در نظر می‌گیرند [۶۶].

Table 3 Probiotic properties of *Pediococcus pentosaceus* isolate

Percentage		properties
77.22 ± 9.64		Survival in simulated gastric condition
35.51 ± 0.93		Auto-aggregation
72.91 ± 0.91		Hydrophobicity
S. enterica	*E. coli*	Co-aggregation
18.43 ± 0.82[b]	48.71 ± 0.65[a]	

Within the row, different letters show significant differences ($p < 0.05$). between co-aggregation ability of the isolate with different food-borne pathogens.

۳-۷- ارزیابی مقاومت به آنتی‌بیوتیک جدایه لاکتیکی

بررسی میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک جدایه *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* نشان داد که این باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک‌های پنیسیلین، سفالوتین، آمپیسیلین و سفازولین حساس بوده و در برابر سفتریاکسون نیز از خود حساسیت نسبی نشان داد (جدول ۲).

Table 4 Antibiotic susceptibility of the *Pediococcus pentosaceus* isolate against common antibiotics.

Zone of Inhibition (mm)	Susceptibility profile	Antibiotic (µg)
8.89±0.25[f]	resistant	Clindamycin (2)
0.00±0.00[g]	resistant	Gentamicin (10)
0.00±0.00[g]	resistant	Streptomycin (10)
0.00±0.00[g]	resistant	Ciprofloxacin (5)
32.91±0.01[a]	sensitive	Penicillin (10)
0.00±0.00[g]	resistant	Vancomycin (30)
12.48±0.56[e]	resistant	Novobiocin (5)
24.21±2.13[c]	sensitive	Cefalotin (30)
27.12±0.11[b]	sensitive	Ampicillin (10)
26.80±0.90[b]	sensitive	Cefazolin (30)
17.31±1.23[d]	intermediate	Ceftriaxone (30)
0.00±0.00[g]	resistant	Nalidixic acid (30)
9.38±0.21[f]	resistant	Imipenem (10)

Different letters are significantly different ($p < 0.05$) within the column

براساس نتایج پژوهش حاضر مشخص شد که جدایه *پدیوکوکوس پنتازاسئوس*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی متفاوتی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی نشان داد. محققین دیگری نیز در پژوهش خود مقاومت آنتی‌بیوتیکی مختلفی از باکتری *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جداشده از بستر تخمیری هوره مشاهده کردند. بدین صورت که این باکتری نسبت به پنیسیلین، هاله عدم رشد ۱۵/۴۵ میلی‌متر از خود نشان داد در حالی که جدایه *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* مطالعه حاضر هاله عدم رشد بزرگتری

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

(۳۲/۹۱ میلی‌متر) داشت که بیان کننده حساسیت بیشتر این باکتری نسبت به پنیسیلین است [۲۱].همچنین در هر دو بررسی، این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین مقاوم بود. براساس پژوهش‌های مختلف مشخص شده که بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک نسبت به ممانعت کننده‌های سازنده دیواره سلولی مانند پنیسیلین‌ها به خصوص پنیسیلین G و ممانعت کننده‌های بتا لاکتاماز حساس بوده اما این باکتری‌ها حساسیت بیشتری نسبت به سفالوسپورین‌ها داشتند [۷۰].

آنتی‌بیوتیک‌ها ترکیباتی هستند که در درمان عفونت‌های باکتریایی موجود در بدن انسان‌ها و حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرند و در دهه‌های اخیر استفاده از آنها بسیار توسعه یافته است. آنتی‌بیوتیک‌ها با ممانعت از ساخت دیواره سلولی، سنتز پروتئین، تداخل در فرآیندهای رونویسی و تکثیر DNA و تولید فولیک اسید اثر مهارکنندگی خود را اعمال می‌کنند [۷۰].البته با استفاده روز افزون از این ترکیبات، مشکلاتی در بین جامعه جهانی به وجود آمده و نگرانی از انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی به باکتری-های بیماری‌زا افزایش یافته است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی یک برهمکنش پیچیده بین انسان‌ها، حیوانات، داروهای آنتی بیوتیکی و محیط زیست می‌باشد[۷۰]که با انتقال ژن توسط عناصر انتقال دهنده (پلاسمیدها، ترانس‌پوزون‌ها و اینتگرون‌ها) از باکتری‌های مقاوم به سایر میکروارگانیسم‌ها صورت می‌گیرد. قابلیت انتقال ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌های جداشده از غذاهای تخمیری و باکتری‌های پروبیوتیک به سایر باکتری‌ها و عوامل بیماری‌زا موجود در روده میزبان یک نکته قابل تامل است که بایستی به آن دقت شود [۲۱].دستگاه گوارش، محیطی مناسب برای فرآیند انتقال ژن می‌باشد که دلیل این امر بالا بودن جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک و در نتیجه بهبود شرایط اتصال سلول به سلول و فرآیند انتقال ژن می‌باشد. با این وجود در پژوهشی محققین بیان کردند که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده از بسترهای تخمیری یک قابلیت بسیار مفید جهت استفاده به عنوان سویه‌های پروبیوتیک موجود در روده است. زیرا این میکروارگانیسم‌ها سبب حفظ جمعیت فلور میکروبی در روده به هنگام درمان‌های آنتی‌بیوتیکی می‌شوند [۷۱]. علاوه بر این، باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از مکانیسم‌های دیگر نظیر جهش‌های کروموزومی، انتقال آمینوگلیکوزیدها و اصلاح آنزیمی قابلیت مقاومت به آنتی‌بیوتیکی خود را کسب می‌کنند [۷۲].

۳-۸- ارزیابی قابلیت همولیز خون توسط جدایه لاکتیکی

بررسی قابلیت همولیز خون توسط جدایه *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* نیز منفی (از نوع گاما) بود و تشکیل هاله همولیز در آن مشاهده نشد.

برخی از محققین نیز در بررسی خود مشاهده کردند که *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جداشده از جو دوسر تخمیرشده فاقد فعالیت همولیزی بود [۱۹]. در بررسی دیگری ارزیابی خاصیت همولیزی باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده از سورگوم در نیجریه نشان داد که تمامی جدایه‌ها همولیز منفی بوده در حالی که یک سویه دارای همولیز بتا بود [۷۳].

معمولا سه نوع فعالیت همولیزی آلفا، بتا و گاما در باکتری‌ها وجود داشته که مشاهده هاله سبز رنگ در محیط کشت خوندار، نشانگر فعالیت همولیزی آلفا و هاله زرد رنگ، همولیز نوع بتا را نشان می‌دهد. اما در همولیز نوع گاما هیچگونه تغییر رنگ یا هاله‌ای در محیط کشت مشاهده نمی‌شود. فقدان فعالیت همولیزی در باکتری‌های اسید لاکتیک برای مصارف انسانی ازجایگاه ویژه-ای برخوردار بوده زیرا فعالیت همولیزی باکتری‌ها می‌تواند لایه-های اپی‌تلیال روده را دچار اختلال کند [۳٤].

٤- نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، جدایه *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* به عنوان باکتری غالب جدا شده از بذر شبدر جوانه‌زده تخمیرشده، خصوصیات ضدمیکروبی و پروبیوتیکی خوبی از خود نشان داد. بر طبق نتایج پژوهش حاضر، *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جداشده از آرد بذر شبدر تخمیرشده از خاصیت ضدقارچی و ضدباکتریایی خوبی در برابر میکروارگانیسم‌های غذازاد برخوردار بود. همچنین مشخص گردید که این باکتری قابلیت استفاده به عنوان سویه پروبیوتیک جهت تامین کشت آغازگر و یا کشت همراه در فرآوری محصولات تخمیری را دارا می‌باشد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

۵- منابع

[1] Wang, Y., Lu, Z., Wu, H., and Lv, F. (2009). Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology, *136*(1), 71-74.

[2] Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. International Dairy Journal, *16*(9), 1058-1071.

[3] Dicks, L., and Botes, M. (2010). Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. Beneficial Microbes, *1*(1), 11-29

[4] Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., and Penna, A. L. B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. Food Engineering Reviews, *4*(2), 124-140.

[5] Crowley, S., Mahony, J., and van Sinderen, D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. Trends in Food Science & Technology, *33*(2), 93-109.

[6] Ispirli, H., and Dertli, E. (2017). Isolation and characterisation of lactic acid bacteria from traditional koumiss and kurut. International Journal of Food Properties, *20*(sup3), S2441-S2449.

[7] Rizzello, C. G., Cassone, A., Coda, R., and Gobbetti, M. (2011). Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. Food Chemistry, *127*(3), 952-959.

[8] Lan, W. T., Chen, Y. S., Wu, H. C., and Yanagida, F. (2012). Bio-protective potential of lactic acid bacteria isolated from fermented wax gourd. Folia Microbiologica, *57*(2), 99-105.

[9] Yoo, J. Y., & Kim, S. S. (2016). Probiotics and prebiotics: present status and future perspectives on metabolic disorders. Nutrients, *8*(3), 173.

[10] De Oliveira Vieira, K. C., Ferreira, C. D. S., Bueno, E. B. T., De Moraes, Y. A., Toledo, A. C. C. G., Nakagaki, W. R., ... and Winkelstroter, L. K. (2020). Development and viability of probiotic orange juice supplemented by *Pediococcus acidilactici CE51*. LWT-Food Science and Technology, *130*, 109637.

[11] Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., and Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. Innovative Food Science & Emerging Technologies, *27*, 15-25.

[12] Kamble, R. D., & Pathade, G. R. (2010). Studies on potential application of representative promising isolates of Lactobacillus for preparation of soft drink like lassie. International Journal of Advanced Biotechnology and Research, *1*(1), 5-10.

[13] Adesulu-Dahunsi, A. T., Jeyaram, K., & Sanni, A. I. (2018). Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based nigerian fermented food products. Food Control, *92*, 225-231.

[14] Peres, C. M., Peres, C., Hernández-Mendoza, A., and Malcata, F. X. (2012). Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria–with an emphasis on table olives. Trends in Food Science & Technology, *26*(1), 31-42.

[15] Toh, Z. Q., Anzela, A., Tang, M. L., and Licciardi, P. V. (2012). Probiotic therapy as a novel approach for allergic disease. Frontiers in Pharmacology, *3*, 171.

[16] Kolodziejczyk-Czepas, J. (2012). Trifolium species-derived substances and extracts—Biological activity and prospects for medicinal applications. Journal of Ethnopharmacology, *143*(1), 14-23.

[17] Peñas, E., Gómez, R., Frías, J., & Vidal-Valverde, C. (2010). Effects of combined treatments of high pressure, temperature and antimicrobial products on germination of mung bean seeds and microbial quality of sprouts. Food Control, *21*(1), 82-88.

[18] 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.

[19] Hajinia, F., Sadeghi, A., Sadeghi Mahoonak, A. R., Khomeiri, M., Maghsoudlou, Y., & Moayedi, A. (2020). Evaluation of probiotic and antifungal properties of the predominant LAB isolated from oat sourdough. Journal of Food Hygiene, *10*(37).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

[20] Ilavenil, S., Vijayakumar, M., Kim, D. H., Valan Arasu, M., Park, H. S., Ravikumar, S., and Choi, K. C. (2016). Assessment of probiotic, antifungal and cholesterol lowering properties of *Pediococcus pentosaceus KCC - 23* isolated from Italian ryegrass. Journal of the Science of Food and Agriculture, *96*(2), 593-601.

[21] Vasiee, A., Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., and Noorbakhsh, H. (2018). Diversity and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from horreh, a traditional Iranian fermented food. Probiotics and Antimicrobial Proteins, *10*(2), 258-268.

[22] 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.

[23] Shirvani, A., Goli, S. A. H., Shahedi, M., & Soleimanian-Zad, S. (2016). Changes in nutritional value and application of thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on microbial and organoleptic markers of Persian clover (*Trifolium resupinatum*) sprouts. LWT-Food Science and Technology, 67, 14-21.

[24] 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.

[25] Rizzello, C. G., Nionelli, L., Coda, R., Di Cagno, R., and Gobbetti, M. (2010). Use of sourdough fermented wheat germ for enhancing the nutritional, texture and sensory characteristics of the white bread. European Food Research and Technology, *230*(4), 645-654.

[26] Abnous, K., Brooks, S. P., Kwan, J., Matias, F., Green-Johnson, J., Selinger, L. B., ... and 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.

[27] Cheong, E. Y., Sandhu, A., Jayabalan, J., Le, T. T. K., Nhiep, N. T., Ho, H. T. M., ... and Turner, M. S. (2014). Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. Food Control, *46*, 91-97.

[28] Jorgensen, J. H., and Turnidge, J. D. (2015). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. Manual of Clinical Microbiology, 1253-1273.

[29] 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.

[30] 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.

[31] Tuo, Y., Yu, H., Ai, L., Wu, Z., Guo, B., and Chen, W. (2013). Aggregation and adhesion properties of 22 Lactobacillus strains. Journal of Dairy Science, *96*(7), 4252-4257.

[32] Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., and Cocolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. Food Research International, *50*(1), 135-142.

[33] 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.

[34] 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.

[35] Fouad, A. A., & Rehab, F. M. (2015). Effect of germination time on proximate analysis, bioactive compounds and antioxidant activity of lentil (*Lens culinaris Medik.*) sprouts. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, *14*(3), 233-246.

[36] Warle, B., Riar, C., Gaikwad, S., & Mane, V. (2015). Effect of germination on nutritional quality of soybean (Glycine Max). Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology, *1*(1.3).

[37] Ohtsubo, K. I., Suzuki, K., Yasui, Y., & Kasumi, T. (2005). Bio-functional components

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]

[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

in the processed pre-germinated brown rice by a twin-screw extruder. Journal of Food Composition and Analysis, *18*(4), 303-316.

[38] Bau, H., Villaume, C., Nicolas, J., & Mejean, L. (1997). Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (Glycine max) seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture, 73, 1-9.

[39] Oguntoyinbo, F. A., and Narbad, A. (2012). Molecular characterization of lactic acid bacteria and in situ amylase expression during traditional fermentation of cereal foods. Food Microbiology, *31*(2), 254-262.

[40] Wahyuni, E., and Taufiq, T. T. (2021). Isolation and identification of goat milk-derived *Lactobacillus paracasei* M104 and *Pediococcus pentosaceus* M103 and their potential use as starter culture for fermentation. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, *2021*, 374-377.

[41] Sáez, G. D., Saavedra, L., Hebert, E. M., and Zárate, G. (2018). Identification and biotechnological characterization of lactic acid bacteria isolated from chickpea sourdough in northwestern Argentina. LWT-Food Science and Technology, *93*, 249-256

[42] Lind, H., Jonsson, H., & Schnürer, J. (2005). Antifungal effect of dairy propionibacteria—contribution of organic acids. International Journal of Food Microbiology, *98*(2), 157-165.

[43] Gänzle, M., and Ripari, V. (2016). Composition and function of sourdough microbiota: From ecological theory to bread quality. International Journal of Food Microbiology, *239*, 19-25.

[44] Jin, J., Nguyen, T. T. H., Humayun, S., Park, S., Oh, H., Lim, S., ... and Kim, D. (2021). Characteristics of sourdough bread fermented with *Pediococcus pentosaceus* and *Saccharomyces cerevisiae* and its bio-preservative effect against *Aspergillus flavus*. Food Chemistry, *345*, 128787.

[45] Gerez, C. L., Torino, M. I., Obregozo, M. D., and de Valdez, G. F. (2010). A ready-to-use antifungal starter culture improves the shelf life of packaged bread. Journal of Food Protection, *73*(4), 758-762.

[46] Muhialdin, B. J., Hassan, Z., and Saari, N. (2018). In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria low molecular peptides against spoilage fungi of bakery products. Annals of Microbiology, *68*(9), 557-567.

[47] Gerez, C. L., Torino, M. I., Rollán, G., and de Valdez, G. F. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. Food Control, *20*(2), 144-148.

[48] Leroy, F., and De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science & Technology, *15*(2), 67-78.

[49] Schnürer, J., and Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. Trends in Food Science & Technology, *16*(1-3), 70-78.

[50] Elsser-Gravesen, D., and Elsser-Gravesen, A. (2013). Biopreservatives. Biotechnology of Food and Feed Additives, 29-49.

[51] Batish, V. K., Roy, U., Lal, R., and Grover, S. (1997). Antifungal attributes of lactic acid bacteria e a review. Critical Reviews in Biotechnology, *17*, 209-225.

[52] Li, H., Zhang, S., Lu, J., Liu, L., Uluko, H., Pang, X., ... and Lv, J. (2014). Antifungal activities and effect of *Lactobacillus casei* AST18 on the mycelia morphology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. Food Control, *43*, 57-64.

[53] Jeske, S., Zannini, E., Lynch, K. M., Coffey, A., and Arendt, E. K. (2018). Polyol-producing lactic acid bacteria isolated from sourdough and their application to reduce sugar in a quinoa-based milk substitute. International Journal of Food Microbiology, *286*, 31-36.

[54] Ayyash, M., Abu-Jdayil, B., Olaimat, A., Esposito, G., Itsaranuwat, P., Osaili, T., ... and Liu, S. Q. (2020). Physicochemical, bioactive and rheological properties of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Pediococcus pentosaceus* M41. Carbohydrate Polymers, *229*, 115462.

[55] Rocha, J. M., and Malcata, F. X. (2016). Microbial ecology dynamics in Portuguese broa sourdough. Journal of Food Quality, *39*(6), 634-648.

[56] Bartkiene, E., Lele, V., Ruzauskas, M., Domig, K. J., Starkute, V., Zavistanaviciute, P., ... and Rocha, J. M. (2020). Lactic acid bacteria isolation from spontaneous sourdough and their characterization including antimicrobial and antifungal properties evaluation. Microorganisms, *8*(1), 64.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

especially *Campylobacter jejuni*. Journal of Medical Microbiology, *62*(4), 637-649.
[66] Shangpliang, H. N. J., Sharma, S., Rai, R., and Tamang, J. P. (2017). Some technological properties of lactic acid bacteria isolated from Dahi and Datshi, naturally fermented milk products of Bhutan. Frontiers in Microbiology, *8*, 116.
[67] Li, Q., Liu, X., Dong, M., Zhou, J., and Wang, Y. (2015). Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. International Journal of Agricultural Policy, 3(2), 84-92.
[68] Tokatlı, M., Gülgör, G., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N., & Özçelik, F. (2015). In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. BioMed Research International, *2015*.
[69] Palachum, W., Chisti, Y., and Choorit, W. (2018). In-vitro assessment of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* WU-P19 isolated from a traditional fermented herb. Annals of Microbiology, *68*(2), 79-91.
[70] Abriouel, H., Muñoz, M. D. C. C., Lerma, L. L., Montoro, B. P., Bockelmann, W., Pichner, R., ... and Benomar, N. (2015). New insights in antibiotic resistance of Lactobacillus species from fermented foods. Food Research International, *78*, 465-481.
[71] Bacha, K., Mehari, T., and Ashenafi, M. (2010). Antimicrobial susceptibility patterns of LAB isolated from wakalim, a traditional ethiopian fermented sausage. Journal of food safety, *30*(1), 213-223.
[72] Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. The Journal of Clinical Investigation, *111*(9), 1265-1273.
[73] Ogunsakin, A. O., Vanajakshi, V., Anu-Appaiah, K. A., Vijayendra, S. V. N., Walde, S. G., Banwo, K., ... & Prabhasankar, P. (2017). Evaluation of functionally important lactic acid bacteria and yeasts from Nigerian sorghum as starter cultures for gluten-free sourdough preparation. LWT-Food Science and Technology, *82*, 326-334.
[57] Bajaj, B. K., Claes, I. J., & Lebeer, S. (2021). Functional mechanisms of probiotics. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, *2021*, 321-327.
[58] Mortazavian, A. M., Mohammadi, R., and Sohrabvandi, S. (2012). Delivery of probiotic microorganisms into gastrointestinal tract by food products. New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology, *10*, 47946.
[59] Kim, J., Muhammad, N., Jhun, B. H., and Yoo, J. W. (2016). Probiotic delivery systems: a brief overview. Journal of Pharmaceutical Investigation, *46*(4), 377-386.
[60] Jin, J., Zhang, B., Guo, H., Cui, J., Jiang, L., Song, S., ... & Ren, F. (2012). Mechanism analysis of acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* subsp. longum BBMN 68 by gene expression profile using RNA-sequencing. Plos One, 7(12), e50777.
[61] Moumita, S., Goderska, K., Johnson, E. M., Das, B., Indira, D., Yadav, R., ... and Jayabalan, R. (2017). Evaluation of the viability of free and encapsulated lactic acid bacteria using in-vitro gastro intestinal model and survivability studies of synbiotic microcapsules in dry food matrix during storage. LWT-Food Science and Technology, *77*, 460-467.
[62] Montville, T. J., and Matthews, K. R. (2012). Physiology, growth, and inhibition of microbes in foods. Food microbiology: Fundamentals and Frontiers, 1-18.
[63] Sharma, S., Kandasamy, S., Kavitake, D., and Shetty, P. H. (2018). Probiotic characterization and antioxidant properties of *Weissella confusa* KR780676, isolated from an Indian fermented food. LWT-Food Science and Technology, *97*, 53-60.
[64] 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*(1), 19-24.
[65] 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,

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1]

[DOI: 10.52547/fsct.19.123.299]

Evaluation of antimicrobial and probiotic properties of the predominant LAB isolated from fermented germinated clover seed

Zarali, M.[1], Sadeghi, A.[2*], Jafari, S.M.[3], Sadeghi Mahoonak, A.[4], Ebrahimi, M.[5]

1. PhD Student of Food Biotechnology, GorganUniversity 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 Materials and Design Engineering, 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. Faculty member, Food, Drug and NaturalProductsHealthResearchCenter, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

ABSTRACT

Recently, the tendency to use probiotic-potential starter cultures among lactic acid bacteria (LAB) isolated from non-dairy fermented substrates has been increased. The aim of this study was to isolate and molecularly identify the predominant LAB isolated from fermented germinated clover seeds, and also to evaluate its probiotic and antifungal properties. The LAB isolate was identified as*Pediococcus pentosaceus*, in accordance with the sequencing results of the PCR products. The antifungal and antibacterial effect of the isolate on *Aspergillus niger* and *Staphylococcus aureus* was significantly ($P < 0.05$) higher than the other studied foodborne fungi and bacteria. Furthermore, *P. pentosaceus* isolate had a good survival (77.22%) in simulated gastrointestinal conditions. The isolate had no hemolytic activity, and its auto-aggregation activity was 35.51%. Also, the rate of co-aggregation of the isolate with *Escherichia coli* and *S. enterica* was equal to 48.71% and 18.43%, respectively. In addition, the bacterium was sensitive to the penicillin, cephalothin, ampicillin and cefazolin antibiotics. Accordingly, it is possible to use the isolate as a probiotic culture with potential biological preservative in the food industry.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2021/ 11/ 06
Accepted 2022/ 01/ 24

Keywords:

Germinated clover,
Antifungal,
Antimicrobial,
Probiotic.

DOI: 10.52547/fsct.19.123.299

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.16.1

*Corresponding Author E-Mail:
Sadeghi.gau@gmail.com