مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی فعالیت ضدمیکروبی جسم سلولی و پالیده کشت حاصل از *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* در شرایط درون‌تنی و مدل غذایی

سید محمدباقر هاشمی[1*]، درنوش جعفرپور[2]

۱- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فسا، فسا، ایران.

۲- استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد فسا، دانشگاه آزاد اسلامی، فسا، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۷

کلمات کلیدی:

لاکتوباسیلوس هلوتیکوس،

فعالیت ضد میکروبی،

پالیده کشت،

آب گیلاس،

باکتری بیماری‌زا.

DOI: 10.22034/FSCT.19.125.1

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.15.4

* مسئول مکاتبات:

hashemi@fasau.ac.ir

چکیده

در این تحقیق، اثر ضد میکروبی جسم سلولی و پالیده کشت حاصل از باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در ماده غذایی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، ابتدا پالیده کشت حاصل از سویه *لاکتوباسیلوس* مذکور جدا و بخشی از آن تحت تیمار حرارتی (۱۰۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه) و بخش دیگر نیز تحت خنثی‌سازی با سود قرار گرفت و با استفاده از روش چاهک و دیسک خاصیت ضد میکروبی آن بر علیه دو باکتری بیماری‌زا شامل *سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین فعالیت ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* در آب گیلاس در طی ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری ارزیابی شد. نتایج نشان داد که پالیده‌های خام (حرارت ندیده) و حرارت دیده توانستند هر دو باکتری بیماری‌زا را مهار کنند، اما پالیده خنثی شده با سود هیچ گونه اثر مهاری نداشت. تلقیح *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* به آب گیلاس به طور موثری توانست از رشد *سالمونلا* و *استافیلوکوکوس* در طی تخمیر جلوگیری کند ($P < ۰/۰۵$). بنابراین بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان از باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و پالیده کشت آن به منظور جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی و به عنوان یک منبع ضد میکروبی طبیعی در صنایع غذایی استفاده نمود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-02]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.15.4]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.1]

۱- مقدمه

در حال حاضر تمایل مصرف کنندگان به مصرف غذاهای تازه، بدون مواد نگهدارنده و کمتر فرآوری شده رو به افزایش است. به منظور برآورده ساختن خواسته‌های مصرف کنندگان و در عین حال اطمینان از ایمنی مواد غذایی، تحقیق در مورد استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی به منظور جایگزین مواد نگهدارنده مصنوعی اهمیت پیدا کرده است. از طرفی دیگر، در سال‌های اخیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا توجه جامعه علمی را به جستجوی ترکیبات جایگزین با فعالیت ضدمیکروبی جلب کرده است [۱]. در این میان، باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتری‌های گرم مثبت، کاتالاز و اکسیداز منفی و غیر اسپورزا هستند که قادرند کربوهیدرات‌ها و الکل‌های سنگین مولکول را عمدتا به اسید لاکتیک تخمیر کنند [۲]. این باکتری‌ها از طریق تولید ترکیبات ضد میکروبی، تحریک سیستم ایمنی، رقابت برای غذا و سایت چسبندگی باعث سرکوب باکتری‌های بیماری‌زا می‌شوند[۳]. باکتری‌های اسید لاکتیک به طور طبیعی در مواد خام مثل شیر، سبزی و حتی در دستگاه گوارش حیوانات و انسان‌ها وجود داشته و می‌توانند به عنوان کشت آغازگر در فرآورده‌های لبنی، گوشت و غلات به کار روند [٤]. باکتری‌های اسید لاکتیک به دلیل تولید ترکیبات مختلف می‌توانند جلوی رشد پاتوژن‌ها را بگیرند. اولین اثر نگهدارندگی این باکتری‌ها مربوط به تولید اسید لاکتیک می‌باشد که باعث کاهش pH شده و از این طریق جلوی رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها را می‌گیرد. دیگر ترکیبات تولید شده توسط آن‌ها شامل اسید استیک، پراکسید هیدروژن، دی استیل، روترین و باکتریوسین‌ها می‌باشند که نقش بسیار مهمی درحفظ و نگهداری مواد غذایی بر عهده دارند [۵]. نکته قابل توجه در مورد باکتری‌های اسید لاکتیک اینست که این دسته از باکتری‌ها به عنوان ارگانیسم‌های ایمن[1] شناخته می‌شوند و بنابراین می‌توانند در رژیم غذایی انسان‌ها به کار روند [٦]. *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* یک باکتری تولید کننده اسید لاکتیک است و به‌طور گسترده‌ای به عنوان یک استارتر ترموفیل با تخمیر همگن (هموفرمنتاتیو) در ساخت پنیرهایی نظیر پنیر سوئیسی و پنیرهای سخت ایتالیایی کاربرد دارد [۷]. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که کاربرد مستقیم باکتری‌های اسید لاکتیک یا حتی پالیده کشت آن‌ها، باکتری‌های نامطلوب را در سینه مرغ، گوشت گاو، نان و پنیر مهار می‌کند [۸ و ۹]. Kareem و همکاران (۲۰۱٤)، خواص بازدارندگی پالیده کشت باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را در شرایط آزمایشگاهی بر علیه *اشریشیا کلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا انتریکا* بررسی کردند و دریافتند که پالیده کشت این باکتری می‌تواند میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی را مهار کند [۱۰]. به علاوه، فعالیت ضد میکروبی باکتری های اسید لاکتیک بر علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مانند *اشریشیا کلی*، *سالمونلا*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* هم در شرایط درون تنی و هم برون تنی گزارش شده است [۱۱].

گیلاس با نام علمی *Prunus avium L* متعلق به جنس آلوسانان (*Prunus*) و تیره گلسرخیان (*Rosaceae*) می‌باشد. این میوه در آب و هوای سرد و معمولاً در کشورهای آمریکا، اروپا و بخشی از آسیا رشد می‌کند. گیلاس سرشار از آنتی‌اکسیدان و ترکیبات ضدالتهاب بوده و در پیشگیری و درمان نقرس مفید است. به علاوه یکی از معدود میوه‌های حاوی ملاتونین است که می‌تواند به درمان بی خوابی کمک کند؛ از این رو به عنوان یک منبع دارویی مفید نیز شمرده می‌شود است [۱۲]. از آنجا که باکتری‌های بیماری‌زا باعث به خطر افتادن ایمنی مواد غذایی و سلامت افراد جامعه می‌شوند، به همین علت یافتن راه‌هایی جهت کنترل رشد آن‌ها در نمونه‌های غذایی به ویژه در زمان نگهداری، از اهمیت زیادی برخوردار است. با توجه به فعالیت ضد میکروبی و خواص عملکردی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* در مواد غذایی می‌توانند به عنوان نگهدارنده زیستی به‌طور گسترده‌ای به منظور مهار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد به کار روند [۱۳]. از این رو، هدف از این تحقیق ارزیابی فعالیت ضد میکروبی پالیده کشت باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* بر علیه باکتری‌های *سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بود و در ادامه اثرات ضد میکروبی این باکتری در نمونه غذایی (آب گیلاس) مورد بررسی قرار گرفت.

1. Generally Recognized As Safe (GRAS)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-02]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.15.4]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.1]

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سویه‌های باکتری

در ایـــن مطالعـــه از(PTCC 1332) *Lactobacillus helveticus* و بـاکتری‌هـای پـاتوژن بـه نـام *Salmonella enterica* subsp. *enteric* (PTCC 1787) و (PTCC 1431) *Staphylococcus aureus* کـه از مرکـز کلکـسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی مرکز پژوهش‌هـای علمـی و صـنعتی ایران خریداری شده بود استفاده گردید. سویه *لاکتوباسیلوس* در محیط کـشت MRS[1] مـایع بـه مـدت ۱۸ سـاعت در دمـای ۳۷ درجـه‌ی سلـسیوس فعـال‌سـازی گردیـد. سـویه *سـالمونلا* و *استافیلوکوکوس* به ترتیب در محیط نوترینت بـراث[2] و تریپتیکـاز سوی براث[3] به مدت ۲٤ ساعت در دمـای ۳۷ درجـه سلـسیوس فعال‌سازی شدند.

۲-۲- بررسی خاصیت ضد میکروبی در شـرایط درون‌تنی

۲-۲-۱- تهیه‌ی پالیده‌ی کشت[4]

برای تهیه‌ی پالیده‌ی کشت، سویه *لاکتوباسیلوس* در ۲۰ میلی‌لیتـر محیط کشت MRS مـایع در دمـای ۳۷ درجـه‌ی سلـسیوس بـه مـدت ۲٤ سـاعت گرمخانـه‌گـذاری گردیـد. سـپس بـه منظـور جداسـازی سـلول‌هـای بـاکتری از محـیط کـشت از سـانتریفیوژ یخچال‌دار (٤۰۰۰g، ۲۰ دقیقه و ٤ درجـه‌ی سلـسیوس) اسـتفاده گردید. مایع رویی جدا و بـرای اطمینـان از عـدم وجـود سـلول باکتری از فیلتر باکتریایی۰/۲ میکرومتر عبور داده شد [١٤]. پالیده به دست آمده برای هر باکتری به سه قـسمت تقـسیم شـد، یـک قسمت به عنوان شاهد، یک قسمت بـا کمـک سـود ۱ نرمـال بـه pH=٦/٥ رسانیده شد و قسمت سوم تحت تیمـار حرارتـی(۱۰۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه) قرار گرفت.

۲-۲-۲- بررسی فعالیت ضدمیکروبی به روش انتـشار در آگار

به منظور بررسی فعالیت ضدمیکروبی بـه روش انتـشار در آگـار، باکتری‌های پاتوژن ابتدا در محیط کشت‌های که برای فعال‌سـازی آن‌ها استفاده شده بود به مدت ٢٤ ساعت در دمـای ۳۷ درجـه‌ی سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از محیط مـایع حاوی باکتری مورد نظر برداشته و در محیط نوترینت آگار کشت گردیدند. سپس، در داخل آن چاهک‌هایی با قطـر ۵ میلـی متـر و بافاصله‌ی ۳۰ میلی‌متر از یکدیگر و از بدنـه‌ی پلیـت ایجـاد شـد. سـپس ۸۰ میکرولیتـر از پالیـده تیمارهـای مختلـف بـه داخـل چاهک‌های ایجادشده در پلیت هـای حـاوی بـاکتری‌هـای مـورد آزمایش ریخته شد. برای جذب محلول به داخل محیط، پلیت هـا به مدت ۲ ساعت در دمای ٤ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفتند. پس از مرحله‌ی جذب، پلیت‌ها در دمـای ۳۷ درجـه‌ی سلـسیوس بـه مدت ۱۸ ساعت نگهداری شدند. پس از اتمام این زمان، اندازه‌ی هاله‌ی بازدارنده تشکیل‌شده با استفاده از خط کـش انـدازه‌گیـری شد [١٥].

۲-۲-۳- بررسی فعالیت ضدمیکروبی به روش دیسک

در بررسی فعالیت ضد میکروبی بـه روش دیـسک، دیـسک‌هـای کاغذی به قطر ۵ میلی متر در پالیده سویه *لاکتوباسیلوس* به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور و دیسک‌ها در دمـای ۳۷ درجـه سلـسیوس بـه مدت ٤ ساعت قرار گرفتند تا کاملا خشک شوند. دیـسک‌هـا بـه بافاصله‌ی ۳۰ میلی متر از یکدیگر و بدنه‌ی پلیت قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت نگهداری گردیدنـد. پـس از اتمـام ایـن زمـان، انـدازه‌ی هالـه‌ی بازدارنده با استفاده از خط کش اندازه‌گیری شد [١٤].

۲-۳- بررسی خاصیت ضدمیکروبـی در شـرایط برون‌تنی

۲-۳-۱- انـدازه گیـری فعالیـت ضـدمیکروبی در آب گیلاس

آب گیلاس طبیعی بدون هیچ گونه افزودنی از مغـازه‌ای در شـهر شیراز خریداری گردید و سپس با کمـک اتـوکلاو بـه مـدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس استریل گردیـد. نمونـه‌هـای آب گـیلاس بـا *سـالمونلا* و *استافیلوکوکوس* در حـدود log CFU/mL ٦/۱-٦/۲ و سویه‌ی *لاکتوباسیلوس* در حـدود log

1. de Man, Rogosa and Sharpe (MRS)
2. Nutrient Broth
3. Trypticase Soy Broth
4. Cell Free Culture Supernatant

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-02]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.15.4]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.1]

CFU/mL ۵/۳ تلقیح شدند. گروه‌های شاهد تنها با سویه‌های پاتوژن یا *لاکتوباسیلوس* تلقیح شدند. پس از آن، انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت انجام شد. برای شمارش سویه‌ی *لاکتوباسیلوس*، *سالمونلا* و *استافیلوکوکوس* به ترتیب از MRS اگار، نوترینت اگار و تریپتیکاز سوی اگار استفاده شد. رقیق سازی نمونه‌ها با استفاده از پیپتون واتر قبل از کشت انجام شد [١٦].

۲-۳-۲- اندازه‌گیری pH

pH آب گیلاس در نمونه‌های مختلف در حین فرآیند تخمیر توسط pH متر Milwaukee Martini ساخت کشور ایتالیا اندازه‌گیری شد [۱۷].

۲-٤- تجزیه وتحلیل آماری

پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. داده‌های بدست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ثبت و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. به منظور بررسی خاصیت ضدمیکروبی پالیده حرارت دیده و حرارت ندیده بر علیه پاتوژن‌های مورد مطالعه از رویه تجزیه واریانس (ANOVA) برای آزمون‌های تکرار شونده استفاده شد و با آزمون تی اختلاف بین آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات جمعیت باکتریایی در تیمارهای مربوطه در نمونه غذایی با استفاده از رویه تجزیه واریانس یک‌طرفه بررسی شد. در مواردی که اثر معنی‌داری بین تیمارها وجود داشت، میانگین‌ها با آزمون دانکن (Duncan's test) مقایسه شدند [۱۸].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- فعالیت ضدمیکروبی پالیده کشت

نتایج آزمون ضد میکروبی پالیده کشت باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* بر علیه دو باکتری پاتوژن با استفاده از دو روش انتشار در آگار و دیسک در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان دادند که پالیده‌های حرارت دیده و حرارت ندیده توانستند هر دو باکتری بیماری‌زا را مهار کنند، اما پالیده خنثی شده با سود هیچ گونه اثر مهاری بر باکتری‌های بیماری‌زای مورد مطالعه نداشت. از مقایسه پالیده حرارت دیده و حرارت ندیده چنین استنباط می‌شود که فعالیت ضدمیکروبی پالیده حتی بعد از حرارت باقی می‌ماند. با توجه به نتایج چنین می‌توان گفت که ترکیبات تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* مقاوم به حرارت بوده به نحوی که حتی دمای بالا را تحمل کرده و اثر ضدمیکروبی آن از بین نرفته است. هم چنین تیمار پالیده با سود و رساندن pH مایع رویی به ۷، نشان داد که اثر بازدارندگی پالیده به طور کامل از بین می رود که احتمال می‌رود علت بازدارندگی، وجود اسید در محیط بوده است و با افزودن سود و خنثی سازی اسید خاصیت بازدارندگی از بین رفته است. این نتایج با یافته‌های Mirnejad و همکاران (۲۰۱۳)، که مشاهده کردند فعالیت ضد میکروبی پالیده *لاکتوباسیلوس کازئی* بر علیه *شیگلا فلکسنری* و *شیگلا سونئی* بعد از تیمار با حرارت باقی مانده اما بعد از خنثی سازی با سود از بین می رود، همخوانی دارد [۱۹]. Tharmaraj و Shah (۲۰۰۹)، گزارش کردند که خنثی‌سازی به وسیله ی سود پالیده کشت اثر بازدارندگی باکتری‌های اسید لاکتیک را از بین می‌برد که می‌توان فعالیت ضد میکروبی پالیده را مربوط به مشتق‌های اسیدی تولید شده و باکتریوسین‌هایی که در pH خنثی فعال نیستند نسبت داد [۲۰]. نتایج مطالعه Tabatabaei Yazdi و همکاران (۲۰۱۵)، بر روی اثر ضد میکروبی متابولیت‌های تولیدی توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک نشان داد که بیشترین فعالیت ضدمیکروبی پالیده‌های حاصل از کشت باکتری‌های اسیدلاکتیک در pH اسیدی بوده و هر چه pH پالیده عاری از سلول جدایه لاکتیکی به سمت خنثی و قلیایی سوق داده می‌شود میزان فعالیت ممانعت‌کنندگی آن کاهش می‌یابد [۲۱]. از آنجا که با خنثی‌سازی پالیده کشت این سویه *لاکتوباسیلوس* عدم هاله رشد مشاهده شد لذا اثر ضد میکروبی آن را می‌توان به تولید اسید لاکتیک نسبت داد. حضور اسید در محیط منجر به کاهش pH شده و شرایط را برای رشد سایر میکروارگانیسم‌ها نامساعد می‌سازد. مکانیسم اثر ضد میکروبی اسیدهای آلی بدین صورت است که این اسیدها، به شکل تفکیک نشده، از غشای سیتوپلاسمی از طریق لایه لیپیدی عبور کرده و وارد سیتوپلاسم می‌شوند. در آنجا به دلیل pH بالای سیتوپلاسم، اسید تفکیک شده و آنیون‌های اسید و پروتون تولید می‌شوند.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-02]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.15.4]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.1]

پروتون‌های تولیدی باعث می‌شوند که pH داخل سلول کاهش یابد و در نتیجه گلیکولیز و انتقال فعال را مهار می‌کند. از طرف دیگر، سلول برای اینکه به حالت قبل خود برگردد، انرژی مصرف کرده و پروتون ها را به بیرون می‌ریزد. در اثر این عمل و با تداوم حضور اسیدهای آلی، ATP مصرف شده و انرژی سلول کاهش می‌یابد که در نهایت با اتمام انرژی، مرگ سلول رخ می‌دهد. به علاوه، pH اسیدی درون سلول باعث آسیب به فعالیت‌های آنزیمی، پروتئین‌ها و ساختار DNA می‌شود و در نتیجه به غشای خارج سلول آسیب می‌زند [۲۲و۲۳].

در روش چاهک، قطر هاله عدم رشد برای پالیده حرارت ندیده و حرارت دیده بر علیه باکتری *استافیلوکوکوس* به ترتیب ۱۶/۵ و ۱۶/۱ میلی‌متر و بر علیه باکتری *سالمونلا* به ترتیب ۱۳/٤ و ۱۳/۱ میلی‌متر بدست آمد. در روش دیسک نیز قطر هاله عدم رشد برای پالیده حرارت ندیده و حرارت دیده بر علیه باکتری *استافیلوکوکوس* به ترتیب ۱۵/۳ و ۱۵/۱ میلی‌متر و بر علیه باکتری *سالمونلا* به ترتیب ۱۲/۵ و ۱۲/۲ میلی‌متر مشاهده شد. با توجه به نتایج بدست آمده، اثر بازدارندگی پالیده‌های کشت در هر دو روش دیسک و چاهک بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر از *سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا* بود، هر چند که اختلاف معنی‌داری بین خاصیت ضد میکروبی پالیده حرارت دیده و حرارت ندیده مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در مطالعه Savadogo و Cheik (۲۰۰٤)، مشخص شد که قطر هاله عدم رشد برای *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در نتیجه تاثیر باکتری‌های اسید لاکتیک در حدود ۸ الی ۱۲ میلی‌متر می‌باشد [۲٤]. با توجه به نتایج، باکتری گرم مثبت در مقایسه با باکتری گرم منفی نسبت به پالیده کشت *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* حساس‌تر بود. احتمالاً تفاوت حساسیت میکروارگانیسم‌های گوناگون به مواد ضد میکروبی به علت ساختار متفاوت میکروارگانیسم‌هاست. باکتری‌های گرم مثبت بر خلاف باکتری‌های گرم منفی، فاقد غشای خارجی در دیواره هستند که این خود می‌تواند سبب شود که ترکیبات فعال در آن نفوذ بهتری داشته باشند. باکتری‌های گرم منفی به علت وجود لایه چربی در لایه بیرونی نفوذناپذیرتر هستند [۱۵]. این نتایج با یافته‌های Khashaie و همکاران (۲۰۱۷)، مطابقت دارد. آن‌ها مشاهده کردند که بیشترین اثر بازدارندگی پالیده‌های کشت *ویسلا سیباریا* بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* و کمترین اثر بازدارندگی آن‌ها نیز بر روی *اشریشیا کلی* می‌باشد [۲۵].

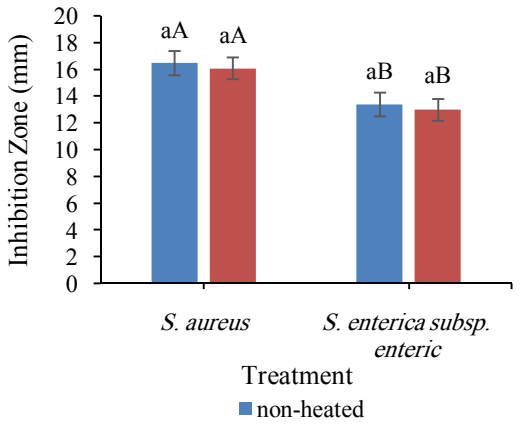

Fig 1 Antimicrobial properties of heat-treated and non-heat treated cell free culture supernatant of *Lactobacillus helveticus* by well method. The same lowercase letters are not significantly different between different treatments for each pathogenic bacteria ($P > 0.05$). Values of the same treatment, followed by the same uppercase letter, are not statistically different ($P > 0.05$).

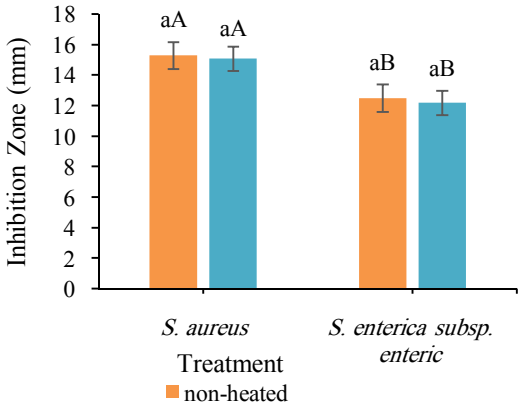

Fig 2 Antimicrobial properties of heat-treated and non-heat treated cell free culture supernatant of *L. helveticus* by disk method. The same lowercase letters are not significantly different between different treatments for each pathogenic bacteria ($P > 0.05$). Values of the same treatment, followed by the same uppercase letter, are not statistically different ($P > 0.05$).

Arrioja و همکاران (۲۰۲۰)، نیز در بررسی خود گزارش کردند که باکتری‌های گرم منفی مقاوم‌تر از باکتری‌های گرم مثبت در برابر اثر بازدارندگی پالیده کشت سویه‌های اسید لاکتیک شامل

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-02]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.15.4]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.1]

لاکتوباسیلوس پلانتاروم[1]، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[2] و *لاکتوباسیلوس ساکئی*[3] هستند [۵].

۳-۲- فعالیت ضدمیکروبی در آب گیلاس

شمارش کلی باکتری‌های *سالمونلا* و *استافیلوکوکوس* مورد مطالعه در حضور و عدم حضور *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* در طی ۲٤ ساعت تخمیر در آب گیلاس مورد بررسی قرار گرفت. در عدم حضور *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* با گذشت زمان تخمیر تعداد هر دو باکتری به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) افزایش یافت، به طوری که تعداد باکتری *سالمونلا* از ٦/۲ به log CFU/mL ۸/۷ و تعداد باکتری *استافیلوکوکوس* از ٦/۱ به log CFU/mL۸/۵ در انتهای زمان تخمیر رسید (شکل ۳).

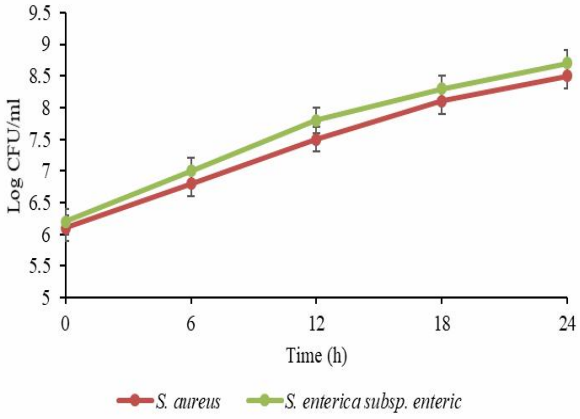

Fig 3 Changes in viable cell counts of pathogenic bacteria in cherry juice. Error bars indicate the standard deviation of viable cell counts in cherry juice without *L. helveticus* during 24 h of incubation.

به منظور بررسی توانایی مهاری سویه‌ی *لاکتوباسیلوس* بر رشد *سالمونلا* و *استافیلوکوکوس* در آب گیلاس تخمیر شده، از هر کدام باکتری‌های بیماری‌زای مورد مطالعه به صورت کشت همزمان با *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* استفاده شد. مطابق شکل ٤، هنگامی که باکتری‌های بیماری‌زا در ترکیب با *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* استفاده شدند، تعداد باکتری‌های *سالمونلا* و *استافیلوکوکوس* به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) کاهش یافت، به نحوی که بعد از ۲٤ ساعت تخمیر، تعداد باکتری *سالمونلا* از ٦/۲ به log CFU/mL ٤/۹ و تعداد باکتری *استافیلوکوکوس* از ٦/۱ به log CFU/mL ٤/۸ رسید. این بدان معناست که سویه‌ی *لاکتوباسیلوس* مورد مطالعه توانسته است به طور موثری از رشد پاتوژن‌های مذکور در طی تخمیر آب گیلاس جلوگیری کند. یافته‌های تحقیق حاضر با گزارش Yang و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت داشت، که نشان دادند تلقیح استارترهای باکتری اسید لاکتیک در برنج رشد *باسیلوس سرئوس* را مهار می‌کند [۲٦]. علاوه بر این، مطالعه دیگری نشان داده است که اسیدهای آلی مهم‌ترین بازدارنده رشد *باسیلوس سرئوس* بوده و اسید لاکتیک را به عنوان ترکیب اصلی بازدارنده رشد میکروبی معرفی کردند [۲۷]. نتیجه مشابهی توسط Zhang و همکاران (۲۰۱٦)، در طی تخمیر شیر گزارش شده است. آنها نشان دادند که تولید اسید لاکتیک توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و کاهش pH به طور قابل‌توجهی از رشد پاتوژن‌ها جلوگیری می‌کند و pH را به عنوان یک عامل بازدارنده اصلی برای تولید ایمن و سالم محصولات تخمیری بیان کردند [۲۸].

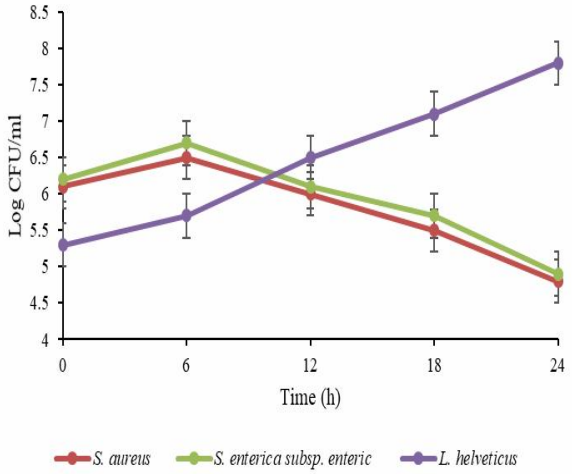

Fig 4 Changes in viable cell counts in fermented cherry juice. Error bars indicate the standard deviation of viable cell counts in cherry juice fermented with *L. helveticus* during 24 h of fermentation.

۳-۳- اندازه‌گیری pH

نتایج اندازه‌گیری میزان pH آب گیلاس در طول زمان تخمیر در شکل ۵ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان pH نمونه آب گیلاس به طور قابل توجهی کاهش یافته (P<۰/۰۵) و از ۳/۹ به ۳ در پایان دوره تخمیر رسید. افزایش

1. *Lactiplantibacillus plantarum*
2. *Lacticaseibacillus rhamnosus*
3. *Latilactobacillus sakei*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-02]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.15.4]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.1]

معنی‌دار (P<۰/۰۵) تعداد *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* در طول دوره تخمیر (شکل ٤) حاکی از رشد این باکتری و تولید اسید لاکتیک است که منجر به کاهش pH شده است. به طور مشابه Bagheri و همکاران (۲۰۲۰)، گزارش کردند که *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* دارای مسیر تخمیر لاکتیکی همگن و دارای رشد تاخیری بوده و از این رو نیازهای رشد بالا و دارای قابلیت تولید اسید بالایی است [۲۹]. Hashemi و Jafarpour (۲۰۲۰)، گزارش کردند که میکروارگانیسم‌هایی مانند سویه‌های *لاکتوباسیلوس* از کربوهیدرات‌های ساده به عنوان منابع کربن و انرژی مناسب برای رشد استفاده می‌کنند که افزایش سطح سلول-های زنده در طی تخمیر، کاهش محتوای گلوکز و فروکتوز و کاهش pH نشان دهنده این روند است [١٦]. به علاوه، افزایش مقدار اسید لاکتیک، اسید فرمیک و اسید پروپیونیک در نتیجه تخمیر آب انار توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مشاهده شده است [۳۰].

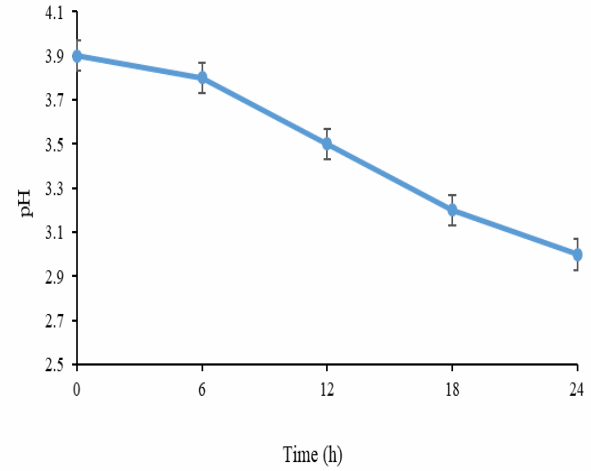

Fig 5 Changes in pH of cherry juice fermented by *L. helveticus*. Error bars display the standard deviation of pH during 24 h of measurement.

٤- نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که محصول رویی حاصل از کشت و جسم سلولی باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* به عنوان یکی از سویه‌های *لاکتوباسیلوس* می‌تواند بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا استفاده شود و متابولیت‌های حاصل از آن درشرایط سخت دمایی فعال بوده و اثرات ضد باکتریایی‌اش پایدار می‌ماند. به علاوه مشخص شد که سویه‌ی *لاکتوباسیلوس* مورد مطالعه اثر مهاری بر رشد *سالمونلا انتریکا زیرگونه انتریکا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در طی تخمیر آب گیلاس دارد. بنابراین با توجه به نتایج می‌توان گفت که پالیده کشت باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* می‌تواند به عنوان یک ترکیب ضد میکروب ارزشمند در جهت مقابله با بیماری‌های عفونی در نظر گرفته شود و از آن جهت جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی به عنوان یک منبع ضد میکروبی طبیعی در محصولات غذایی و صنایع دارویی استفاده کرد.

٥- منابع

[1] Cotter, P.D., Ross, R.P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? Nature Reviews Microbiology, 11, 95–105.

[2] Danilova, T.A., Adzhieva, A.A., Danilina, G.A., Polyakov, N.B., Soloviev, A.I., & Zhukhovitsky, V.G. (2019). Antimicrobial activity of supernatant of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic microorganisms. Bulletin of experimental biology and medicine, 167(6), 751-754.

[3] Jafarpour, D., Shekarforoush, S.S., Ghaisari, H. R., Nazifi, S., Sajedianfard, J., & Eskandari, M.H. (2017). Protective effects of synbiotic diets of *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus plantarum* and inulin against acute cadmium toxicity in rats. BMC Complementary Medicine, 17, 1–8.

[4] Jafarpour, D, Shekarforoush, S.S., Ghaisari, H.R., Nazifi, S., & Sajedianfard, J. (2015). Impact of synbiotic diets including inulin, *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus plantarum* on intestinal microbiota of rat exposed to cadmium and mercury. Veterinary Science Development, 5(2).

[5] Arrioja-Bretón, D., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2020). Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. Food Control, 115, 107286.

[6] Nekoueian, M., & Jafarpour, D. (2021). Feasibility study of production of synbiotic low calorie yogurt by green banana flour and evaluation of physicochemical, textural and

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-02]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.15.4]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.1]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-02]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.15.4]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.1]

and their application in cream. Food Science and Technology, 18(115), 339-349. [in Persian]

[16] Hashemi, S. M. B., & Jafarpour, D. (2020). Fermentation of bergamot juice with *Lactobacillus plantarum* strains in pure and mixed fermentations: Chemical composition, antioxidant activity and sensorial properties. LWT, 131, 109803.

[17] Jafarpour, D., Amirzadeh, A., Maleki, M., & Mahmoudi, M. R. (2017). Comparison of physicochemical properties and general acceptance of flavored drinking yogurt containing date and fig syrups. Foods and Raw materials, 5(2).

[18] Jokari, M. M., & Jafarpour, D. (2021). Comparison of the effectiveness of two prebiotics inulin and green banana flour on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus coagulans* in low-calorie synbiotic yogurt. Food Science and Technology, 18(117), 49-63. [in Persian]

[19] Mirnejad, R., Vahdati, A. R., Rashidiani, J., Erfani, M., & Piranfar, V. (2013). The antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* culture supernatant against multiple drug resistant clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* in vitro. Iranian Red Crescent Medical Journal, 15(2), 122.

[20] Tharmaraj, N., & Shah, N. P. (2009). Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. International Food Research Journal, 16(1), 261-276.

[21] Tabataba i Yazdi, F., Ali Zadeh Behbahani, B., Mortazavi, S. A., & Tabataba i Yazdi, F. (2015). Diversity of Lactic Acid Bacteria communities in “Ash kardeh" with using 16s rRNA gene sequence analysis and antimicrobial activity evaluation of like-bacteriocin compounds. Food Science and Technology, 13(53), 1-14.

[22] Hashemi, S. M. B., & Jafarpour, D. (2020). Ultrasound and malic acid treatment of sweet lemon juice: Microbial inactivation and quality changes. Journal of Food Processing and Preservation, 44(11), e14866.

[23] Hashemi, S. M. B., Jafarpour, D., & Gholamhosseinpour, A. Antimicrobial activity of Carum copticum and Satureja khuzestanica essential oils and acetic acid in vapor phase at sensorial characteristics of it. Food Science and Technology, 18(116), 277-292. [in Persian]

[7] Griffiths, M.W., & Tellez, A.M. (2013). *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. Frontiers in Microbiology, 4, 30.

[8] 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.

[9] da Costa, W.K.A., de Souza, G.T., Brandão, L.R., de Lima, R.C., Garcia, E.F., dos Santos Lima, M., ... & Magnani, M. (2018). Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. Food Research International, 108, 172-182.

[10] Kareem, K.Y., Hooi Ling, F., Teck Chwen, L., May Foong, O., & Anjas Asmara, S. (2014). Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of *Lactobacillus plantarum* using reconstituted media supplemented with inulin. Gut pathogens, 6(1), 1-7.

[11] Karska-Wysocki, B., Bazo, M., & Smoragiewicz, W. (2010). Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Microbiological research, 165(8), 674-686.

[12] Azarfam, M., Hashemiravan, M., & Asadollahi, S. (2021). Production of Probiotic Fermented Beverage Based on Mixture of Sweet Cherry, Red. Food Safety and Processing, 1(1), 1-16.

[13] Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2018). Biopreservatives as agents to prevent food spoilage. In Microbial contamination and food degradation (pp. 235-270). Academic Press.

[14] Hashemi, S.M.B., Shahidi, F., Mortazavi, S.A., et al (2016) Study of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from traditional Kurdish cheese in comparison to reference strains against some pathogens. Food Science and Technology, 103-113.

[15] Jafarpour, D., Hashemi, S. M. B., & Ghaedi, A. (2021). Study the antibacterial properties of different parts of saffron extract

of Food Microbiology, 103(1), 69-77.

[28] Zhang, Z., Tao, X., Shah, N. P., & Wei, H. (2016). Antagonistics against pathogenic *Bacillus cereus* in milk fermentation by *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its anti-adhesion effect on Caco-2 cells against pathogens. Journal of dairy science, 99(4), 2666-2674.

[29] Bagheri, F., Mirdamadi, S., Mirzaei, M., & Safavi, M. (2020). Production of Functional Fermented Milk by Lactobacilli Isolated from Traditional Iranian Dairy Products. Innovative food technologies, 7(2), 243-255.

[30] Mousavi, Z. E., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., Hadinejad, M., Emam-Djomeh, Z., & Mirzapour, M. (2013). Effect of fermentation of pomegranate juice by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* on the antioxidant activity and metabolism of sugars, organic acids and phenolic compounds. Food Biotechnology, 27(1), 1-13.

different relative humidities and temperatures in peanuts. Journal of Food Processing and Preservation, e16269.

[24] Savadogo, A., Ouattara, C. A., Bassole, I. H., & Traore, A. S. (2004). Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. Pakistan Journal of nutrition, 3(3), 174-179.

[25] Khashaie, M., Ebrahimi, M., & Sadeghi, A. (2017). Investigating of the antimicrobial effects of isolated *Weissella cibaria* and its cell free culture filtrate obtained from different growth phases. Iranian Journal of Medical Microbiology, 11(2), 42-52.

[26] Yang, Y., Tao, W. Y., Liu, Y. J., & Zhu, F. (2008). Inhibition of *Bacillus cereus* by lactic acid bacteria starter cultures in rice fermentation. Food Control, 19(2), 159-161.

[27] Røssland, E., Langsrud, T., & Sørhaug, T. (2005). Influence of controlled lactic fermentation on growth and sporulation of *Bacillus cereus* in milk. International Journal

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-02]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.15.4]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.1]

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-02]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.15.4]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.1]

Antimicrobial activity of bacterial cell and cell free culture supernatant of *Lactobacillus helveticus in-vitro* and in a food model

Hashemi, S. M. B. [1*], Jafarpour, D.[2]

1. Associate professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Fasa University, Fasa, Iran.
2. Assistant professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Fasa Branch, Islamic Azad University, Fasa, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 01/ 16
Accepted 2022/ 04/ 16

Keywords:

Lactobacillus helveticus,
Antimicrobial activity,
Cell free culture supernatant,
Cherry juice,
Pathogen.

DOI: 10.22034/FSCT.19.125.1
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.15.4

*Corresponding Author E-Mail:
hashemi@fasau.ac.ir

ABSTRACT

In this study, the antimicrobial properties of bacterial cell and cell free culture supernatant of *Lactobacillus helveticus* was investigated both in vitro and in vivo (food). For this purpose, at first, cell free culture supernatant (CFS) was prepared from the mentioned *Lactobacillus* strain and then divided into three groups (control, treated by heat (100 °C for 15 min) and neutralized by NaOH). Antimicrobial activity of supernatant treated or no treated was investigated utilizing agar well diffusion and Disk diffusion method against two pathogenic bacteria including *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and *Staphylococcus aureus*. Moreover, the antimicrobial activity of *L. helveticus* in cherry juice was evaluated during 24 h of incubation. The results showed that unheated and heated CFS were able to inhibit both pathogenic bacteria, but neutralized CFS had no antimicrobial activity. Inoculation of *L. helveticus* in cherry juice effectively (P <0.05) prevented the growth of *Salmonella* and *Staphylococcus* during the fermentation period. Therefore, based on the results, *L. helveticus* and its CFS can be used as an alternative to chemical preservative and as a natural antimicrobial source in the food industry.