بررسی اثر ضد کپکی جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان بر کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم* به عنوان شاخص فساد میکروبی آبمیوه

ندا نیری[۱]، محمدرضا عدالتیان[۲*]، محمد باقر حبیبی نجفی[۳]، معصومه بحرینی[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
٤- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/٦/۱۱)

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی اثر ضد کپکی ۱۹ جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* که از مراحل مختلف تولید پنیر سنتی لیقوان (۳ جدایه از شیر خام، ۸ جدایه از دلمه و ۸ جدایه از پنیر تازه لیقوان) بر کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم* (PTCC 89046) به عنوان شاخص فساد کپکی آبمیوه است. جهت بررسی اثر ضد کپکی آن ها از روش نقطه گذاری و روش نفوذ در چاهک استفاده شد. به منظور بررسی خواص تکنولوژیکی یا فاکتورهای فیزیکوشیمیایی سوپرناتانت شامل دماهای۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت ۱۰۰درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۰ دقیقه، ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه (شرایط اتوکلاو)، pHهای ۲ تا ۷ و رقت های مختلف استفاده شد. رقت سازی سریالی دوتایی به منظور ارزیابی تیتر سوپرناتانت فاقد سلول بر روی کپک شاخص انجام شد. یافته ها نشان داد که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* سویه C28 دارای بالاترین خاصیت ضد کپکی در هر دو روش نقطه گذاری و نفوذ در چاهک بوده است، به طوری که با افزایش pH اثر ضد کپکی کاهش یافت. در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه هیچ گونه تاثیری مشاهده نگردید. همچنین جدایه C28 با فاکتور (AU/ml)۱٦۰دارای بالاترین تیتر ضد کپکی بود. در نتیجه می توان گفت که گونه های جدا شده از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان یا عصاره فاقد سلولی آن ها را می توان به عنوان یک زیست نگهدارنده در مواد غذایی به کار برد.

کلید واژگان: *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، اثر ضد کپکی، *پنیسیلیوم اکسپانسوم*، آبمیوه

* مسئول مکاتبات: edalatian@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

۱- مقدمه

امروزه، مصرف کنندگان تمایل بیشتری نسبت به مصرف غذاهای عاری از مواد شیمیایی و نگهدارنده و دارای مواد طبیعی از خود نشان می‌دهند، به همین دلیل اخیراً مطالعات زیادی در مورد امکان جایگزین کردن نگهدارنده‌های شیمیایی با ترکیبات طبیعی در غذاهای مختلف صورت گرفته است. در نتیجه توجه صنعت غذا به سوی ترکیبات ضد میکروبی طبیعی جلب شده است. در این میان، باکتری های اسید لاکتیک[1]، جایگزینی مناسب بجای نگهدارنده های شیمیایی محسوب می شوند [۱].

از طرف دیگر، فساد قارچی علاوه بر زیان اقتصادی برای صنایع نوشیدنی و آبمیوه، سبب نگرانی جدی ارگان های نظارتی در مورد سلامتی انسان می شود. رشد قارچی در ماده غذایی می تواند منجر به تولید مایکوتوکسین هایی شود که به عنوان سم برای انسان و حیوان شناخته می شوند [۱].

مایکوتوکسین‌هایی که اغلب در غذای انسان یافت میشوند، عمدتاً متعلق به جنس‌های *آسپرژیلوس*، *فوزاریوم* و *پنیسیلیوم* هستند. *آسپرژیلوس‌ها* و *پنیسیلیوم ها* به عنوان دامنه وسیعی از ریزسازواره‌های فاسد کننده غذا گزارش شده اند؛ در این میان *پنیسیلیوم‌ها* به دلیل تولید پاتولین در میوه ها و عصاره فشرده شده حاصل از آن، که در نهایت منجر به تولید آبمیوه می‌شود، مورد توجه هستند [۲]. از طرفی کار کردن با *پنسیلیوم*ها آسانتر و ایمن‌تر است [۱]. پاتولین باعث اختلالات کروموزومی در سلول های گیاهی و حیوانی می شود و یک ترکیب سرطان زا می باشد [۳]. قارچ ها یکی از مهم ترین ریزسازواره های مولد فساد در محصولات غذایی هستند. سالانه ۱۰-۵ ٪ غذای جهان به علت فساد قارچی ضایع و غیر قابل استفاده می‌شود [٤]. لذا استفاده از نگهدارنده و ترکیبات ضد میکروبی در این قبیل محصولات ضروری به نظر می رسد.

گزارشات بسیاری مبنی بر تولید ترکیبات ضد باکتریایی به وسیله باکتری های اسید لاکتیک وجود دارد. اما در مورد تاثیر ضد قارچی باکتری های اسید لاکتیک تحقیقات به نسبت کمتری صورت گرفته است. ترکیبات ضد قارچی باکتری های اسید لاکتیک شامل متابولیت هایی مانند: اسیدهای آلی، ترکیبات پروتئینی و ترکیبات با جرم مولکولی کم (کمتر از Da ۱۰۰۰)، باکتریوسین ها هیدروژن پراکسید، دی استیل و Co_2 می‌باشد [۵-۸].

باکتریوسین ها، گروه بزرگی از پپتید های دارای خاصیت ضد میکروبی[2] را تشکیل می دهند. این پپتید ها از طریق ریبوزوم سنتز می شوند. در مورد مکانیسم سنتز یا طرز عملکرد آن ها اطلاعات کمی در دست است. طبیعت شیمیایی باکتریوسین ها طوری است که می توان آن ها را به عنوان نگهدارنده طبیعی در نظر گرفت که معمولا فعالیتشان به وسیله پروتئاز یا پپتیداز کاهش می یابد. هر چند این فرضیه وجود دارد که آن ها تحت شرایط استرس های محیطی و شرایط سخت فیزیولوژیکی تولید می شوند. بیشتر تحقیقات منتشر شده در مورد باکتریوسین های حاصل از باکتری های اسید لاکتیک نشان دهنده این است که ماهیت آن آبدوست است اگرچه ممکن است باکتریوسین هایی وجود داشته باشند که طبیعت چربی دوستی قوی داشته باشند [۹].

امروزه، از ترکیبات شناخته شده ضد قارچی با جرم مولکولی کم، می توان به: reuterin (MW148) از *لاکتوباسیلوس رئوتری* [۱۰و ۱۱] و hydroxylated fatty acids (MW 188-244) 3- از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* *MiLAB 14* [۱۲] و phenyllactic acid (MW 166) و 4-hydroxy-phenyllactic acid (MW 182) از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* *13 21B*) و benzoic acid (MW 122.1) methylhydantoin (MW 114) و mevalonolactone (MW 130.1) از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* *VTTE-78076* [۱٤] و چندین دی پپتید حلقوی (MW 244-262) که به وسیله گونه های *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس*، *لاکتوباسیلوس ساکی*، *لاکتوباسیلوس کورینفورمیس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* [۱٦-۱٤] اشاره کرد.

پنیر لیقوان، مهمترین پنیر محلی و سنتی در ایران است؛ که محبوبیت عام دارد. این پنیر، از پنیر های حاصل از شیر خام گوسفند می باشد به طوریکه هیچ فرایند حرارتی خاصی (پاستوریزاسیون) روی آن صورت نمی گیرد. همچنین در تولید این پنیر از هیچ آغازگر میکروبی خاصی استفاده نمی شود،

1. LAB

2. Antimicrobial Peptides (AMPS)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

بنابراین محتوی میکروبی آن می تواند ناشی از فلور طبیعی شیر خام باشد [۱۷].

هدف این مطالعه، بررسی تاثیر ضد کپکی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* های جدا شده از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان (شامل مرحله شیر[1] ، دلمه[2] و پنیر تازه لیقوان[3]) بر کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم* به عنوان شاخص فساد میکروبی آبمیوه و بررسی اثر عوامل مختلف تکنولوژیکی مانند: pH و دما و رقت های مختلف (آزمون تیتر) بر روی آن است.

۲- مواد و روش ها

برای بررسی اثر ضد کپکی جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان، از ۱۹ جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* هایی که قبلاً توسط روش PCR[4] و به کمک توالی یابی ژن16S rRNA تا حد جنس و گونه شناسایی شده بودند استفاده گردید [۱۷]. کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم* (PTCC 89046) به عنوان شاخص استفاده شد.

جهت بررسی اثر ضد کپکی جدایه های مذکور در سطح محیط کشت از روش نقطه گذاری[5] و برای بررسی اثر ضد کپکی مایع عاری از سلول (محلول رویی) جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از روش نفوذ در چاهک[6] استفاده گردید.

۲-۱-آماده سازی محلول اسپوری

کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم* (PTCC 89046) در محیط کشتPDA[7] (مرک) شیب دار و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد تا ظهور اسپور و رسیدن به مرحله اسپوری (در حدود ۵-۳ روز)گرمخانه گذاری شد. سپس با تکان دادن شدید همراه با آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۵ ٪ حجمی-حجمی توئین ۸۰، اسپورها را جدا [۸] و سپس میزان اسپورها به وسیله لام هموسایتومتر، شمارش گردید [۱۸].

1. Milk
2. Curd
3. Lighvan Fresh
4. Polymerase Chain Reaction
5. Agar Spot
6. Well Diffussion Assay
7. Potato Dextrose Agar

۲-۲-آماده سازی محلول رویی[8] فاقد سلول(CFE)[9]

پس از کشت متحرک جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در داخل اینکوباتور شیکر دار مدل INSEL, Hamble, SO3 8DH, England به مدت ۲٤ ساعت در MRS broth (مرک) توده سلولی با دورg ×۹۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جدا شدند و سپس سوپرناتانت بدست آمده با استفاده از فیلتر سرنگی ۰/٤۵ میکرومتر(استات سلولز) استریل شد [۸].

۲-۳-روش نقطه گذاری

جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به مدت ٤۸ ساعت درمحیط کشت MRS broth و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از سپری شدن این مدت و ظهور کدورت در لوله های آزمایش، از هر جدایه به میزان ۵ میکرولیتر در پلیت های حاوی MRS آگار نقطه گذاری شد، سپس پلیت ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. در مرحله بعد، پلیت ها با محیط کشت PDA حاوی آگار نرم (۰/۷۵درصد آگار) که دارای 10^6 اسپور به ازای هر میلی لیتر بود، پوشانده شدند و سپس در دو دمای ۲۵ و ۳۰ درجه با ۲ تکرار قرار داده شدند. در نهایت پلیت ها از لحاظ قطر هاله شفاف مورد بررسی قرار گرفتند [۱۹].

۲-٤-روش نفوذ در چاهک

در پلیت های PDA (۱/۵ درصد وزنی حجمی آگار) که با 10^6 اسپور کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم* به ازای هر۲۰ میلی لیتر تلقیح شده و چاهک هایی به قطر ٦ میلی متر ایجاد شده بود، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی فاقد سلول جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ریخته شد. در مرحله بعد به منظور انتشار بهتر ترکیبات ضد میکروبی در آگار، به مدت ۱ ساعت در دمای یخچال قرار گرفتند و سپس به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه گرمخانه گذاری شدند. در نهایت، پلیت ها از لحاظ قطر هاله شفاف در اطراف چاهک ها مورد بررسی قرار گرفتند [۸].

8. Supernatant
9. Cell Free Extract

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

۲-۵- آزمون های تکنولوژیکی

۲-۵-۱-تاثیر pH های مختلف بر فعالیت ضد کپکی محلول رویی جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

بدین منظور از pH ۲ تا ۷ [۷-۲] استفاده گردید. بدین صورت که پس از تهیه محلول رویی به آنها HCl و NaOH ۱ نرمال اضافه شد [۲۰]. پس از تنظیم pH ، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی هر جدایه به درون چاهک‌ها ریخته شد. پس از حدود ۱ ساعت درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت قرار داده شد. این آزمایش، برای تمام ۱۹ جدایه در هر pH و با حداقل ۲ تکرار انجام گرفت. نتایج به وسیله اندازه گیری قطر هاله بازدارندگی و به صورت میانگین گزارش گردیدند.

۲-۵-۲- تاثیر دماهای مختلف بر فعالیت ضد کپکی محلول رویی جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

جهت بررسی این تیمار از دماهای ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ و ۳۰ دقیقه [۲۱]، ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه (شرایط اتوکلاو) و ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت [۱۹] استفاده گردید. محلول رویی بدون هیچ گونه تیمار حرارتی به عنوان نمونه کنترل به کار رفت. این نمونه ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به درون چاهک ها ریخته شد. پس از حدود ۱ ساعت درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت قرار داده شد. این آزمایش در هر درجه حرارت، برای تمامی ۱۹ جدایه و با حداقل ۲ تکرار انجام گرفت.(نکته قابل توجه اینکه، تیمار دو بار تکرار نشده است، بلکه آزمایش یا بعبارتی قرار دادن محول رویی ایزوله ها در چاهک ها، دو بار تکرار شده است). نتایج به وسیله اندازه گیری قطر هاله بازدارندگی و به صورت میانگین گزارش گردیدند.

۲-۵-۳-آزمون تیتر(عیار گیری) بر فعالیت ضد کپکی محلول رویی جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

برای این منظور، از نمونه هایی که در روش نفوذ در چاهک دارای هاله بازدارندگی بودند استفاده گردید. بدین صورت که پس از تهیه محلول رویی فاقد سلول جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مورد نظر، رقت های مختلفی از محلول رویی (رقت یک دوم، یک چهارم، یک هشتم و یک شانزدهم و یک سی و دوم) از آن تهیه گردید. محلول رویی فاقد سلول بدون رقت به عنوان نمونه کنترل به کار رفت. عیار گیری به صورت بالاترین رقتی که خاصیت ضد کپکی را از خود نشان می دهد به صورت واحد اختیاری به ازای میلی لیتر (AU/ml)[1] بیان می شود. سپس تیتر ضد قارچی به صورت (1000/d).D محاسبه می گردد، که D فاکتور رقت و d میزان محلول رویی افزوده شده می باشد. d در این جا ۱۰۰ میکرولیترمی باشد. (میزان تلقیح محلول رویی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک است). آزمایش بالا با ۲ تکرار صورت گرفته و نتایج به صورت میانگین گزارش شدند [۸].

۲-۷- طرح آماری و آنالیز داده ها

این تحقیق، در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و به صورت آزمون فاکتوریل صورت گرفت. در این پژوهش برای آنالیز داده های مربوطه از نرم افزار(Mini Tab (Version 16 استفاده گردید. مقایسه میانگین ها با نرم افزار MSTATC صورت گرفت. نمودارها با نرم افزار Excel تنظیم شدند. تمامی آزمایشات با دو تکرار صورت گرفتند.

۳- نتایج و بحث

در جدول ۱ نتایج مربوط به اثر ضد کپکی ۱۹ جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با روش نقطه گذاری بر کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم* در دو درجه حرارت مختلف گرمخانه گذاری (۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد) آورده شده است. نتایج به صورت میانگین دو تکرار از قطر هاله بازدارندگی گزارش شدند. بیشترین قطر هاله مربوط به جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* سویه C28 با قطر ۱۳ میلی متر و کمترین قطر هاله مربوط به سویه LF57 با قطر ٦ میلی متر می باشد.

همان طور که در جدول (۱) مشخص شده است در حدود ۵۳ درصد جدایه ها دارای خاصیت ضد کپکی هستند. از نظر قطر هاله شفاف تفاوت معنی داری بین دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد وجود دارد، به طوری که اکثراً در دمای ۳۰ درجه سانتی

1. arbitrary units per ml

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

گراد قطر هاله بازدارندگی بیشتر از ۲۵ درجه سانتی گراد بوده است.

جدول ۱ اثر ضد کپکی جدایه *های لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان با روش نقطه گذاری بر کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم* در دو درجه حرارت مختلف گرمخانه گذاری

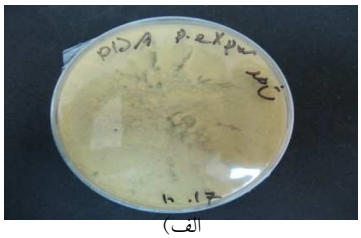
جدایه	میانگین قطر هاله	
	دمای ۲۵ درجه سانتیگراد	دمای ۳۰ درجه سانتیگراد
M6	٤±٠	٤±٠
M8	٤±٠	٤±٠
M11	٤±٠	٤±٠
C22	٤±٠	٤±٠
C24	٤±٠	٤±٠
C25	٨±٠/٧٠٧*	٨±٠
C26	٦±٠/٧٠٧	٦/٥±٠/٧٠٧
C27	٩/٥±٠/٧٠٧	١١ ± ١/٤١٤
C28	١٣±٠/٧٠٧	١٣±٠
C29	٦±٠/٧٠٧	٦/٥±٠
C30	٧±٠/٧٠٧	٨±٠/٧٠٧
LF47	٤±٠	٤±٠
LF48	٥/٧٥±٠/٣٥٣	٦/٢٥±٠/٣٥٣
LF49	٤±٠	٤±٠
LF51	٤±٠	٤±٠
LF52	٨/٥±٠/٧٠٧	٩±٠/٧٠٧
LF55	٩/٧٥±٠/٣٥٣	١٠/٥±٠/٧٠٧
LF56	٤±٠	٤±٠
LF57	٦±٠/٧٠٧	٦±٠/٧٠٧

*تمامی اعداد گزارش شده حاصل از مجموع قطر هاله شفاف وقطر نقطه قرارداده شده (قطر نقطه ٤ میلیمتر در نظر گرفته شده است) و بر حسب واحد میلی متر می باشند . همچنین داده های گزارش شده به صورت میانگین دو تکرار به همراه انحراف (SD) می باشد. در مواردی که انحراف معیار صفر شده است، چون عدد بدست آمده برای هر دو تکرار یکی بوده است و به عبارت دیگر انحراف معیار دو تکرار صفر بوده است.

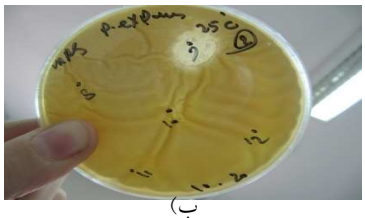
C مخففCurd به معنی دلمه و LF مخففLighvan Fresh (پنیر تازه لیقوان) و M مخفف Milk (شیر) است.

این عامل می تواند به دلیل رشد بهتر کپک در دمای ۲۵درجه سانتی گراد نسبت به ۳۰ درجه سانتی گراد باشد و دیگر آنکه با توجه به مزوفیل بودن باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، امکان رشد و تولید متابولیت توسط این باکتری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نسبت به ۲۵ درجه سانتی گراد بیشتر امکان پذیر است [۱۷]. ولی اثر متقابل نوع جدایه‌ها و دماهای مورد بررسی تفاوت معنی داری نداشتند. در تحقیقی که وانگ و همکاران (۲۰۱۱) بر روی خواص ضد قارچی جدایه های *لاکتوباسیلوس* جدا شده از کومیس بر روی دو کپک *پنی سیلیوم راکوفورتی و آسپرژیلوس نایجر* انجام دادند، مشخص شد که اکثر جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* با روش نقطه گذاری، اثر ممانعت کنندگی قوی تا متوسط از خود نشان دادند [۲۰]. توما و همکاران (۲۰۰۷) گزارش دادند که برخی سویه های جدا شده از پنیر ادام، ممانعت کنندگی شدیدی در برابر *Fusarium proliferatum* و بعد از آن گونه های جنس *Penicillium* و *Aspergillus niger*از خود نشان دادند[۲۲].

می توان به این نتیجه رسید که از بین ۱۹ جدایه مورد بررسی، در ۱۰ جدایه خاصیت ضد کپکی وجود داشت.



الف)

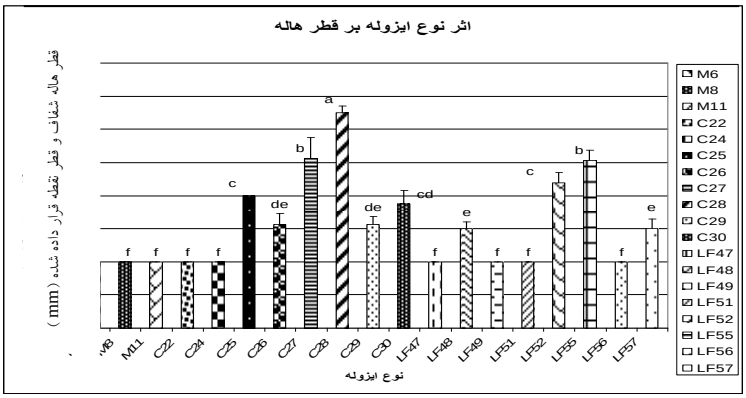


ب)

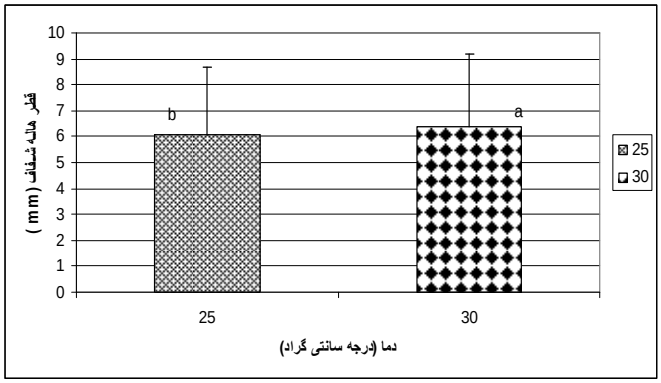
ج)

شکل ۱ نمونه شاهد کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم* (الف) و جدایه هایی که بر آن خاصیت ضد کپکی دارند(ب و ج)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]



شکل ۲ اثر ۱۹ جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مورد بررسی بر روی قطر هاله شفاف (قطر نقطه قرار داده شده ٤ میلی متر در نظر گرفته شده است.)



شکل ۳ تاثیر دمای گرمخانه گذاری مورد استفاده در روش نقطه گذاری بر خاصیت ضد کپکی جدایه های لاکتوباسیلوس پلانتاروم از نظر قطر هاله شفاف بر حسب میلی متر

در جدول شماره ۲ نتایج مربوط به روش نفوذ در چاهک بر کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم* آورده شده است.

بیشترین قطر هاله مربوط به جدایه C28 با قطر ۸ میلی متر و کمترین قطر هاله مربوط به جدایه LF57 با قطر ۳ میلی متر بود (قطر چاهک ایجاد شده ٦میلی متر بوده است).

جدول ۲ نتایج روش نفوذ در چاهک بر کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم*

شماره جدایه	میانگین قطر هاله در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد
M6	۰
M8	۰
M11	۰
C22	۰
C24	۰
C25	٤±۰/۷۰۷*
C26	۰
C27	۰
C28	۸
C29	۰
C30	٤/٥±۰/۷۰۷
LF47	۰
LF48	۰
LF49	۰
LF51	۰
LF52	٥±۰/۷۰۷
LF55	٦/٥±۰/۷۰۷
LF56	۰
LF57	۳

*تمامی اعداد گزارش شده حاصل از تفاضل قطر هاله شفاف از قطر چاهک ایجاد شده و بر حسب واحد میلی متر می باشند. (قطر چاهک ٦ میلیمتر می باشد) همچنین داده های گزارش شده به صورت میانگین دو تکرار به همراه انحراف (SD) می باشد. در مواردی که انحراف معیار گزارش نشده است، چون عدد بدست آمده برای هر دو تکرار یکی بوده است، انحراف معیار دو تکرار صفر بوده است و از نوشتن انحراف معیار صفر در این موارد صرفنظر شده است.

C مخففCurd به معنی دلمه و LF مخففLighvan Fresh (پنیر تازه لیقوان) و M مخفف Milk (شیر) است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

می توان به این نتیجه رسید که از ۱۹ جدایه مورد بررسی به روش نفوذ در چاهک، ٦ جدایه خاصیت ضد کپکی از خود نشان دادند.

در روش نفوذ در چاهک که نتایج آن در جدول (۲) آمده است در حدود ۳۱ درصد جدایه ها دارای خاصیت بازدارندگی بر کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم* بوده اند. نکته قابل توجه این است که در هر دو روش (روش نقطه گذاری و روش نفوذ در چاهک) در جدایه های مربوط به شیرخام هیچ گونه خاصیت ضد کپکی مشاهده نشد، این در حالی است که ۷۵٪ جدایه های مربوط به دلمه و ۵۰ ٪ جدایه های مربوط به پنیر تازه لیقوان دارای خاصیت ضد کپکی بودند.

این عامل را می توان احتمالاً به دلیل اختلاف بین زیر گونه های مختلف باکتری های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مربوط دانست؛ چون در تعیین جدایه ها به روش توالی یابی PCR این باکتری ها تا حد گونه شناسایی شده اند و در نتیجه ممکن است اختلاف بین زیر گونه ها، سبب تفاوت در قطر هاله شفاف مشاهده شده توسط آن ها باشد. عدالتیان و همکاران (۲۰۱۱)، تنوع زیادی را دربین سویه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان با کمک روش rep-PCR مشاهده و گزارش دادند [۱۷].

در بسیاری از موارد مکانیسم عمل ضد میکروبی را نمی توان تعیین کرد، چون ترکیبی از چندین عامل، برای ایجاد اثر هستند. این واکنش ها می توانند بستگی زیادی به محیطی که باکتری های اسید لاکتیک در آن قرار گرفته اند داشته باشند و بنابراین می توانند از غذایی به غذای دیگر متفاوت باشند [۲۳]. معمولاً در روش نقطه گذاری عاملی که سبب ایجاد هاله شفاف بازدارندگی می‌شود مربوط به ترکیبات ضد میکروبی وابسته به کلنی[1] مانند اسید های چرب و آب اکسیژنه که مسئول ایجاد خاصیت ضد میکروبی در محیط کشت جامد یا همان نقطه گذاری می باشند [٢٤]؛ اما در روش نفوذ در چاهک یا بررسی ترکیبات ضد میکروبی در محیط مایع عوامل مختلفی از جمله مواد بازدارنده موجود در پالیده کشت میکروبی (محلول رویی) مانند باکتریوسین ها و اسید های آلی مانند اسید لاکتیک مسئول ایجاد هاله شفاف بازدارندگی هستند. موارد دیگری مانند رئوترین، دی استیل، ایزومر های D اسید آمینه و غیره نیز موثرند [۲۵].

درپژوهشی که توسط رز و همکاران (۲۰۰۷) بر روی ترکیبات ضد قارچی باکتری های اسید لاکتیک و به خصوص *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* انجام گرفته، چنین گزارش شده است که احتمالاً اسید های آلی مسئول اصلی اثر ضد کپکی باشند [۱۹]. در تحقیقات به عمل آمده توسط والریو وهمکاران (۲۰۰۹) چنین عنوان شده است که نقش اصلی ضد میکروبی مربوط به اسید های آلی از جمله اسید لاکتیک و اسید استیک است در حالی که تولید دیگر اسید ها بستگی به شرایط و محیط کشت دارد [٢٦]. آن چه مشخص است این است که فرم اسید لاکتیک یونیزه نشده به غشای سیتوپلاسمی سلول کپک نفوذ کرده و منجر به کاهش pH داخلی سلول و تخریب نیروی حرکتی پروتون Proton Motive Force (PMF) درغشای انتقالی شده و در نهایت سبب مرگ سلول کپک می شود؛ و در نتیجه از تبدیل فرم رویشی به فرم اسپوری کپک و در نهایت تکثیر بیشتر کپک جلوگیری خواهد شد [۲۷].

عامل دیگر خاصیت ضد میکروبی باکتری های اسید لاکتیک را می توان به خصوصیت شلاته کننده اسید های آلی مانند اسید لاکتیک، اسید استیک ، اسید فرمیک و غیره دانست؛ که این اسید ها عناصر ضروری برای رشد، مانند آهن را شلاته می کنند و در نتیجه به عنوان یک عامل دیگر ممانعت کننده از رشد یاد می شود. در این بین، اسید لاکتیک مهم ترین خاصیت ضد میکروبی را دارا می باشد [۲۸].

علاوه بر این، استورم و همکاران ۲۰۰۲و مگناسون و همکاران ۲۰۰۳، تولید ترکیبات ضد قارچی دی پپتید های حلقوی به وسیله *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را گزارش نموده اند[۱۵ و ١٦]. برخی گزارشات حاکی از آن است که *لاکتوباسیلوس* ها می توانند تولید اسید فنیل لاکتیک کنند که فعالیت ضد قارچی دارد. از آن جمله مطالعات یانگ و چانگ ۲۰۱۰ است که نمونه ای از این ترکیبات تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را گزارش نموده اند [۸].

تحت شرایط خاصی برخی از *لاکتوباسیل* ها در اثر فعالیت لیپولیتیک خود ممکن است تولید اسید چرب کنند، فعالیت ضد قارچی اسید های چرب بستگی به طول زنجیره، غلظت و pH

1. Colony – associated antimicrobial compound

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

محیط دارد. فعالیت ضد میکروبی اسید های چرب ناشی از مولکول تفکیک نشده است، نه آنیون، زیرا pH تاثیر زیادی بر روی فعالیتشان ندارد ولی در pH پایین اثر کشندگی آن ها افزایش می یابد [۲۹].

در جدول شماره ۳ نتایج مربوط به تاثیر pH های مختلف بر فعالیت ضد کپکی محلول رویی حاصل از باکتری های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، آورده شده است. بیشترین تاثیر در pH =۲ و کمترین تاثیر در pH =۷ مشاهده گردید.

جدول ۳ تاثیر pH های مختلف محلول رویی فاقد سلول ۱۹ جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر *پنیسیلیوم اکسپانسوم*

شماره جدایه	قطرنمونه شاهد	pH=۲	pH=۳	pH=٤	pH=٥	pH=٦	pH=۷
M6	۰	۳±۰/۷۰۷*	۲/٥±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
M8	۰	۳±۰/۷۰۷	۳	۰	۰	۰	۰
M11	۰	۳/٥±۰/۷۰۷	۳±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
C22	۰	۳±۰/۷۰۷	۲/٥±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
C24	۰	۳/٥±۰/۷۰۷	۳±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
C25	٤±۰/۷۰۷	٦/٥±۰/۷۰۷	٥±۰/۷۰۷	٤/٥	٤	۰	۰
C26	۰	۳±۰/۷۰۷	۲/٥±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
C27	۰	۳±۰/۷۰۷	۲±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
C28	۸	۱۲±۰/۷۰۷	۱۰±۱/٤۱٤	۹±۰/۷۰۷	۸±۰/۷۰۷	٤/٥±۰/۷۰۷	۰
C29	۰	۳±۰/۷۰۷	۳	۰	۰	۰	۰
C30	٤/٥±۰/۷۰۷	۸±۰/۷۰۷	۷±۰/۷۰۷	٥/٥±۰/۷۰۷	٤±۰/۷۰۷	۰	۰
LF47	۰	۳±۰/۷۰۷	۲/٥±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
LF48	۰	۳±۰/۷۰۷	۲±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
LF49	۰	۳±۰/۷۰۷	۲/٥±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
LF51	۰	۲/٥±۰/۷۰۷	۲±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
LF52	٥±۰/۷۰۷	۸/٥±۰/۷۰۷	۷/٥±۰/۷۰۷	٥±۰/۷۰۷	٤±۰/۷۰۷	۰	۰
LF55	٦/٥±۰/۷۰۷	۹±۰/۷۰۷	۷/٥±۰/۷۰۷	٥±۰/۷۰۷	٤±۰/۷۰۷	۰	۰
LF56	۰	۳/٥±۰/۷۰۷	۲/٥±۰/۷۰۷	۰	۰	۰	۰
LF57	۳	٥/٥±۰/۷۰۷	٤±۰/۷۰۷	۳/٥±۰/۷۰۷	۲±۰/۷۰۷	۰	۰

*تمامی اعداد گزارش شده حاصل از تفاضل قطر هاله شفاف از قطر چاهک ایجاد شده و بر حسب واحد میلی متر می باشند .(قطر چاهک ٦ میلی متر بوده است.). همچنین داده های گزارش شده به صورت میانگین دو تکرار به همراه انحراف (SD) می باشد. در مواردی که انحراف معیار گزارش نشده است، چون عدد بدست آمده برای هر دو تکرار یکی بوده است ، انحراف معیار دو تکرار صفر بوده است.

نتایج تاثیر pH های مختلف مایع عاری از سلول جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم* (جدول ۳) نشان می دهد که بیشترین تاثیر ضد کپکی در۲= pH وجود دارد به طوری که حتی جدایه هایی که در نمونه شاهد فاقد اثر ضد کپکی بودند در ۲و ۳= pH خاصیت ضد کپکی از خود نشان دادند. این طور به نظر می رسد که بسیاری از مواد ضد میکروبی از جمله باکتریوسین ها و مواد شبه باکتریوسین به طور قابل ملاحظه ای نسبت به شرایط اسیدی در مقایسه با شرایط قلیایی مقاوم تر هستند. از نظر پایداری جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان نسبت به pH های متفاوت کاملاً مشهود است که جدایه C28 در مقایسه با سایر جدایه ها نسبت به شرایط به شدت اسیدی(مانند pH برابر با ۲) و همچنین شرایط کمتر اسیدی(مانند pH برابر با ٦) مقاوم تربوده است، چون قطر هاله بازدارندگی بیشتری داده است و در۷ = pH

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

هیچ گونه خاصیت ضد کپکی مشاهده نشده است. همچنین در pH = ٦ به جز جدایه C28 در سایر جدایه ها خاصیت ضد کپکی وجود نداشت. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج وانگ و همکاران (۲۰۱۱) که بر روی خواص ضد قارچی جدایه های *لاکتوباسیلوس* از کومیس بر دو کپک *پنی سیلیوم راکوفورتی و آسپرژیلوس نایجر* انجام دادند، همخوانی دارد. به طوری که یافته های آنان نیز نشان می دهد که بیشترین فعالیت ضد قارچی در pH = ۳-۳/۸ مشاهده شد و با افزایش pH (از ۳/۸ تا ۷) قطر هاله شفاف حاصل از تاثیر بازدارندگی کاهش می یابد [۲۰] و همچنین نتایج حاصل، با نتایج پژوهش والریو و همکاران (۲۰۰۹) که به بررسی فعالیت ضد قارچی باکتری های اسید لاکتیک جداشده از گندم دوروم ایتالیایی بر روی کپک های *پنیسیلیوم روکوفورتی و آسپرژیلوس نایجر* پرداخته بودند، مطابقت دارد. به طوری که در pH بالاتر از ٤ فعالیت ضد قارچی کاهش می یابد [٢٦]. نکته قابل توجه در مورد اثر pH های مختلف بر فعالیت ضد قارچی جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* این بود که این جدایه ها در pH های اسیدی که اغلب در آبمیوه جات مشاهده می شود، فعالیت ضد کپکی بیشتری را بر کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم* که عامل و شاخص فساد آبمیوه جات است، از خود نشان دادند. این امر یک نقطه قوت و قابل توجه جهت پتانسیل بکار گیری این سویه ها در محصولات اسیدی از جمله آبمیوه جات می تواند باشد.

در جدول ٤ نتایج مربوط به اثر دماهای مختلف بر خاصیت ضد کپکی محلول رویی جدایه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* آورده شده است.

جدول ٤ تاثیر محلول رویی فاقد سلول۱۹ جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در دماهای مختلف بر کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم*

شماره جدایه	*قطر نمونه شاهد*	۸۰° C ٦۰ دقیقه	۱۰۰° C ۱۰ دقیقه	۱۰۰° C ۳۰ دقیقه	۱۲۱° C ۱۵ دقیقه
M6	۰	۰	۰	۰	۰
M8	۰	۰	۰	۰	۰
M11	۰	۰	۰	۰	۰
C22	۰	۰	۰	۰	۰
C24	۰	۰	۰	۰	۰
C25	٤±۰/۷۰۷*	۳/۵±۰/۷۰۷	٤±۰/۷۰۷	۳±۰/۷۰۷	۰
C26	۰	۰	۰	۰	۰
C27	۰	۰	۰	۰	۰
C28	۸	٤±۰/۷۰۷	۷±۰/۷۰۷	٦/۵±۰/۷۰۷	۰
C29	۰	۰	۰	۰	۰
C30	٤/۵±۰/۷۰۷	۲/۵±۰/۷۰۷	۳±۰/۷۰۷	۲±۰/۷۰۷	۰
LF47	۰	۰	۰	۰	۰
LF48	۰	۰	۰	۰	۰
LF49	۰	۰	۰	۰	۰
LF51	۰	۰	۰	۰	۰
LF52	۵±۰/۷۰۷	۳±۰/۷۰۷	٤±۰/۷۰۷	۳±۰/۷۰۷	۰
LF55	٦/۵±۰/۷۰۷	٤/۵±۰/۷۰۷	۵±۰/۷۰۷	٤/۵±۰/۷۰۷	۰
LF56	۰	۰	۰	۰	۰
LF57	۳	۲/۵±۰/۷۰۷	۲±۰/۷۰۷	۰	۰

*تمامی اعداد گزارش شده حاصل از تفاضل قطر هاله شفاف از قطر چاهک ایجاد شده و بر حسب واحد میلی متر می باشند . (قطر چاهک ٦ میلی متر بوده است.). همچنین داده های گزارش شده به صورت میانگین دو تکرار به همراه انحراف (SD) می باشد. در مواردی که انحراف معیار گزارش نشده است، چون عدد بدست آمده برای هر دو تکرار یکی بوده است ، انحراف معیار دو تکرار صفر بوده است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

نتایج تاثیر مایع عاری از سلول (CFE) در تیمارهای مختلف درجه حرارت بر فعالیت ضد قارچی کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم* (جدول ٤) نشان می دهد که در به کار گیری دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه تمامی جدایه ها خاصیت ضد کپکی خود را از دست داده اند، درحالی که تمامی جدایه ها به جز جدایه LF57 در اعمال دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه خاصیت ضد کپکی از خود نشان دادند. نکته قابل تامل دیگر آن است که قطر هاله بازدارندگی در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بیشتر از قطر هاله بازدارندگی در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه بوده است. این نشان می دهد که مقاومت حرارتی در یک دمای ثابت (دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد) در زمان ۳۰ دقیقه کمتر از زمان ۱۰ دقیقه بوده است. در نتیجه ترکیبات ضد میکروبی و شبه باکتریوسینی با افزایش دما و یا افزایش زمان در صورت اعمال حرارت (در این جا ۱۰۰ درجه سانتی گراد) به حرارت حساس شده و خاصیت خود را از دست می دهند. این مقاومت نسبی به حرارت نشان می دهد که در مایع عاری از سلول ترکیباتی با وزن مولکولی کم وجود دارد [۲۰]. نتایج مطالعه حاضر با نتایج حاصل از پژوهش کاردوسو وهمکاران (۲۰۱۲) موافق است. آنان به بررسی اثر ضد میکروبی مایع عاری از سلول *انتروکوکوس فکالیس* بر روی مخمرها، قارچ ها و باکتری ها پرداختند و بیان کردند که با افزایش دما و یا افزایش زمان حرارت دهی، اثر ضد میکروبی کاهش می یابد[۲۱]. نکته کاربردی و قابل توجه در مورد اثر درجه حرارت های مختلف این است تمام جدایه ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد که شرایط استریل کردن در اتوکلاو می باشد، خاصیت ضد کپکی خود را از دست داده اند، ولی در صنعت آبمیوه جات و نوشیدنی های اسیدی که خطر آلودگی به کپک هایی از قبیل *پنیسیلیوم اکسپانسوم* وجود دارد، از این فرایند حرارتی شدید استفاده نمی شود بلکه از دماهای پایین تر مانند دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد یا کمتر برای پاستوریزاسیون آبمیوه جات استفاده می شود. همانطور که در جدول ملاحظه می شود تمام جدایه ها به جز یک جدایه، دمای ۱۰۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه را تحمل نموده اند و خواص ضد کپکی خود را حفظ کرده اند. این نکته، احتمال به کارگیری این جدایه ها یا محلول رویی آنها را در مواد غذایی اسیدی مانند آبمیوه جات ، که نیاز به فرایند های حرارتی شدید و بالای ۱۰۰ درجه سانتیگراد ندارند، را تقویت می بخشد.

در جدول ۵ نتایج مربوط به آزمون تیتر (عیار گیری) آورده شده است. این آزمون تنها برای جدایه هایی که دارای هاله بازدارندگی در روش نفوذ در چاهک بودند به کار رفت. زیرا فقط می توان تاثیر رقت را در نمونه های دارای بازدارندگی بررسی نمود.

جدول ۵ آزمون تیتر محلول رویی فاقد سلول ۱۹ جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم*

رقت	C25	C27	C28	C30	LF55	LF57
شاهد	+	+	+	+	+	+
۱/۲	+	+	+	+	+	+
۱/٤	+	+	+	+	+	−
۱/۸	−	+	+	−	+	−
۱/۱٦	−	−	+	−	−	−
۱/۳۲	−	−	−	−	−	−

+ وجود هاله بازدارندگی بر روی کپک *پنسیسلیوم اکسپانسوم*

− عدم وجود هاله بازدارندگی بر روی کپک *پنسیسلیوم اکسپانسوم*

همان طور که بیان شد تیتر ضد قارچی به صورت (1000/d).D محاسبه می گردد. بنابراین بیشترین تیتر ضد کپکی مربوط به جدایه C28 با فاکتور (AU/ml)۱٦۰ و کمترین آن مربوط به جدایه LF57 با فاکتور(AU/ml) ۲۰ می باشد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

نتایج آزمون تیتر مایع عاری از سلول روی فعالیت ضد قارچی کپک *پنیسیلیوم اکسپانسوم* (جدول ۵) نشان می دهد که بیشترین فعالیت ضد کپکی مربوط به جدایه C28 با فاکتور ۱۶۰ در میان ٦ جدایه مورد بررسی بوده است که این فعالیت ضد کپکی را می توان به دلیل تفاوت در مقدار نهایی درجه خلوص ترکیبات ضد قارچی مربوط دانست. اعتقاد بر این است که ترکیبات ضد کپکی به طور مخلوط، از فرم های خالص شده فعالیت بیشتری دارند [۸].

٤- نتیجه گیری

به طور خلاصه در این پژوهش برای بررسی اثر ضد کپکی جدایه های مورد نظر از روش نقطه گذاری و نفوذ در چاهک استفاده شد و تاثیر هر کدام از متغیرها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش pH اثر ضد کپکی کاهش می یابد به طوری که بیشترین تاثیر در۲و۳= pH وجود داشت. با افزایش دما و یا افزایش زمان، شاهد کاهش اثر ضد کپکی بودیم به طوری که در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه هیچ گونه اثر ضد کپکی مشاهده نشد. در آزمون نیز تیتر جدایه C28 با فاکتور ۱٦۰(AU/ml)دارای بالاترین اثر بود.

۵- منابع

[1] Guo, J., Mauch, A., Galle, S., Murphy, P., Arendt, E. K., Coffey, A., 2011, Inhibition of growth of *Trichophyton tonsurans* by *Lactobacillus reuteri*, Journal of Applied Microbiology, 474-483.

[2] Mauch, A., Dal Bello, F., Coffey, A., Arendt, E. K., 2010, The use of *Lactobacillus brevis PS1* to in vitro inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley , International Journal of Food Microbiology, 141, 116–121.

[3] Jams, M. J., Loessner, M. J., Golden, D. A., 2005, Modern food microbiology, Mortazavi, S. A., Ziaolhagh, H., Mashhad, Ferdowsi university of mashhad Publication, 583-585.

[4] Pitt, J. J., Hocking, A. D, 1999, Fungi and Food Spoilage, 2nd edn. Gaithersburg, MD: Aspen Publications, 19-24.

[5] Dodd, H.M., Gasson, M. J., 1994, Bacteriocins of lactic acid bacteria. In: Gasson, M. J., deVos, W.M. (Eds.), Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria, Blackie Academic and Professional, London , 211–251.

[6] Lindgren, S.E., Dobrogosz, W. J., 1990, Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, FEMS Microbiology Reviews, 87, 149–164.

[7] Stiles, M. E., 1996 , Biopreservation by lactic acid bacteria, Antonie van Leeuwenhoek, 70, 331–345.

[8] Yang, E. J., Chang, H.C., 2010 , Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum AF1* isolated from kimchi, International Journal of Food Microbiology, 139, 56-63.

[9] Earshaw, R.G., 1992, The Antimicrobial Action of Lactic Acid Bacteria: Natural Food Preservation Systems, volum1, Elsevier Science Publishers LTD, 217-220.

[10] Chung, T. C., Axelsson, L., Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J., 1989, In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri* , Microbial Ecology in Health and Disease, 2 , 137–144.

[11] Nakanishi, K., Tokuda, H., Ando, T., Yajima, M., Nakajima, T., Tanaka, O., Ohmomo, S., 2002, Screening of lactic acid bacteria having the ability to produce reuterin, Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria, 13, 37–45.

[12] Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J., Kenne, L., 2003, Antifungal 3-hydroxyfatty acids from *Lactobacillus plantarum MiLAB 14*, Applied and Environmental Microbiology, 69, 7554–7557.

[13] Lavermicocca , P., Valerio , F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobetti, M., 2000, Purification and characterization of novel antifungal compounds from thesour dough *Lactobacillus plantarum strain 21B*, Applied and Environmental Microbiology, 66, 4084–4090.

[14] Niku-Paavola, M. L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., Haikara, A., 1999, New types of antimicrobial compounds produced by

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

[22] Tuma , Š. , Vogensen , F.K. , Plockova , M. , Chumchalova , J.,2007,Isolation of antifungal active *lactobacill* from Edma cheese, Acta Alimentaria, 36 (4), 405–414.

[23] G.Earnshaw ,R. ,1992 , The Antimicrobial Action of Lactic Acid Bacteria: Natural Food Preservation Systems Volume 1, Elsevier Science Publishers,211-232.

[24] Alegría, Á., Delgado, S. , Roces, C., López, B., Mayo, B., 2010, Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk, International Journal of Food Microbiology, 143, 61–66.

[25] Piard ,J. ,Desmazeaud ,C. ,1991, Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1.Oxygen metabolites and catabolism end-products , Lait,71(5),525-541.

[26] Valerio, F., Favilla, M., De Bellis, P., Sisto, A., 2009, Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products, Systematic and Applied Microbiology, 32, 438–448.

[27] Alakomi, H. L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., Helander, I. M .,2000, Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane , American Society for Microbiology, 66,2001-2005.

[28] Sirgid, C. J., Tine, L. A., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J., Naggy, I., 2006, Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus GG* against , *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid , FEMS Microbial Lett, 259, 89- 96.

[29] Yang, Z., 2000, Anti microbial compounds and extracellular polysaccharides produced by Lactic Acid Bacteria: structures and properties,Ph.D thesis, University of Helsinki.

Lactobacillus plantarum, Journal of Applied Microbiology, 86, 29–35.

[15] Magnusson, J., Strögren, J., Schnürer, J., 2003, Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria, FEMS Microbiology Letters,219, 129–135.

[16] Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A., Schnürer, J., 2002, *Lactobacillus plantarum MiLAB 393* produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid, Applied and Environmental Microbiology, 68, 4322–4327.

[17] Edalatian ,M. R. ,Habibi Najafi,M.B.,Mortazavi,S.A.,Alegria,Nassiri,M. R.,S.,Bassami,M.R., Mayo,B., 2012 , Microbial diversity of the traditional Iranian cheeses Lighvan and Koozeh, as revealed by polyphasic culturing and culture-independent approaches, Dairy Science and Tecnology,92,75-90.

[18] Jafarpur, B. , Sabokkhiz , M.A. ,Jahanbakhsh ,V. , 2012 ,Laboratory Methods in Plant Pathology ,Mashhad , Ferdowsi university of mashhad Publication ,277-279.

[19] Rouse ,S. ,Harnett ,D. , Vaughan ,A. ,Van Sinderen,D.,2007, Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods, Journal of Applied Microbiology,104,915-923.

[20] Wang, H., Shi, J., Zhang, H., Qi,W.,2011, A survey of some antifungal properties of lactic acid bacteria isolates from koumiss in China, International Journal of Dairy Technology,64,585-590.

[21] Cardoso, M., Manzo, R., Tonarelli, G., Simonetta, A., 2012, Characterization of a Cell free supernatant obtained from cultures of *Enterococcus faecalis DBFIQ E24* with antagonistic activity against bacteria,yeast and moulds, International Journal of Dairy Technology,65,568-577.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

Evaluation of antimould effect of *lactobacillus plantarum* from different production stages of lighvan cheese on *penicillium expansum* as an indicator in fruit juice spoilage

Nayeri, N. [1], Edalatian, M. R. [2*], Habibi Najafi, M. B. [3], Bahreini, M. [4]

1. M.Sc. Student , Department of Food science and Technology, Faculty of Agriculture , Ferdowsi University
2. Assistant Professor, Department of Food science and Technology , Faculty of Agriculture , Ferdowsi University
3. Professor, Department of Food science and Technology , Faculty of Agriculture , Ferdowsi University
4. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University

(Received: 93/3/10 Accepted: 93/6/11)

The objective of this experiment was to investigate the antimould effect of 19 *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different production stages of Lighvan cheese (3, 8 and 8 strains from raw milk, curd and fresh cheese stages, respectively) a traditional raw milk cheese, on *Penicillium expansum* (PTCC 89046) as an indicator in fruit juice spoilage. This antimould spectrum was determined by agar spot and well diffusion method, followed by determination the influence of different technological or physico-chemical factors including temperature (80°C for 1 h, 100°C for 10 min, 100°C for 30 min and 121° C for 15 min) and pH(2 to 7) and different dilution (Titre test) . Serial twofold dilutions were conducted to the CFE in order to assess of CFE Titre against mould indicator. Findings revealed that *Lactobacillus plantarum* strain C28 has the highest antimould properties in both antimicrobial methods (Agar Spot and Well Diffussion Assay) and antimould effect showed decreasing trend with pH increasing. In 121 ° C for 15 min, no antimould effect was observed. The *Lactobacillus plantarum* strain C28 showed the highest titre factor of 160 (AU / ml) . Finally, we can assume that these strains which isolated from different production stages of Lighvan cheese or their Cell Free Extract (CFE) can be used as biopreservative in food systems.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, Antimould, *Penicillium expansum*, Fruit juice

* Corresponding Author E-Mail Address: edalatian@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]