



### ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی و ضد قارچی باکتری اسید لاکتیک غالب جدا شده از آرد بلوط (*Quercus persica*) تخمیر شده

حسین پور عبدالله<sup>۱</sup>، علیرضا صادقی<sup>۱\*</sup>، مریم ابراهیمی<sup>۲</sup>، مهدی کاشانی نژاد<sup>۱</sup>، هدی شهیری طبرستانی<sup>۱</sup>، جلال محمدزاده<sup>۳</sup>

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- مرکز تحقیقات سلامت فرآورده‌های غذایی، دارویی و طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

۳- گروه علوم و صنایع غذایی بخش تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۲۷	
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۳۱	
کلمات کلیدی:	
بلوط تخمیر شده، جدایه لاکتیکی غالب، خصوصیات پروبیوتیکی، روماند فاقد سلول.	ارزیابی خصوصیات باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از بستره‌های تخمیری که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند همواره احتمال مواجهه با جدایه‌های منحصر به فرد را در پی دارد. در این پژوهش، باکتری اسید لاکتیک غالب با تکرار فرایند مایه‌گیری از تخمیر آرد بلوط، جداسازی و با استفاده از PCR شناسایی گردید. سپس ویژگی‌های پروبیوتیکی (شامل مقاومت به اسید و صفرا، ضد باکتریایی، خود اتصالی و دگر اتصالی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و قابلیت همولیز خون) و همچنین اثر ضد قارچی این جدایه لاکتیکی مورد مطالعه قرار گرفت. توالی‌یابی محصولات PCR منجر به شناسایی پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی به عنوان جدایه لاکتیکی غالب گردید. جدایه مذکور در تیمار متوالی اسید و صفرا، ۷۲ درصد زنده‌مانی خود را حفظ نمود. همچنین تاثیر بازدارنده جدایه لاکتیکی بر روی باسیلوس سرئوس به شکل معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) از سایر شاخص‌های باکتریایی غذازاد بیشتر بود. علاوه بر این، رومانند فاقد سلول خام حاصل از کشت پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی جدا شده نیز به طور کامل از رشد باسیلوس سرئوس ممانعت کرد اما رومانند فاقد سلول ختنی شده آن تاثیر بازدارنده‌ای بر سالمونلا انتریکا نداشت. جدایه لاکتیکی دارای قابلیت خود اتصالی و دگر اتصالی با اشرشیا کلی نیز بود و رفتار همولیزی از خود نشان نداد. اثر ضد قارچی جدایه لاکتیکی در برابر اسپرژیلوس نایجر تایید گردید. با توجه با قابلیت‌های پروبیوتیکی و ضد قارچی مناسب پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی جدا شده از تخمیر آرد بلوط می‌توان از آن به عنوان کشت میکروبی آغازگر، همراه، پروبیوتیک و یا محافظت کننده در صنایع تخمیری استفاده نمود.
DOI: 10.52547/fsct.19.124.171	
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.124.1.8	
* مسئول مکاتبات: Sadeghi.gau@gmail.com	

## ۱- مقدمه

پروبیوتیک‌ها به میکروارگانیسم‌های زنده‌ای گفته می‌شوند که وقتی با تعداد مشخص به مصرف برسند دارای اثرات سلامتی‌بخش باشند. تحمل شرایط نامساعد دستگاه گوارش توسط این میکروارگانیسم‌ها باعث حفظ فلور میکروبی روده در حالت طبیعی، محافظت در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای معدی-روده‌ای، ارتقاء سیستم ایمنی، کاهش سطح کلسترول و فشار خون، فعالیت ضد سرطانی و بهبود دسترسی به مواد مغذی می‌شود [۱].

تخمیر انواع آرد و آب، یکی از قدیمی‌ترین فرایندهای زیست‌فناوری در تولید مواد غذایی است که پیدایش آن به مصر باستان و ۳۰۰۰ سال قبل از میلاد بر می‌گردد. این تخمیر یکی از بهترین منابع شناخته شده برای باکتری‌های اسید لاکتیک پروبیوتیک و ضد قارچ نیز به شمار می‌آید. عملکردهای چنین تخمیری به طور عمده به متابولیسم باکتری‌های اسید لاکتیک بستگی دارد. باکتری‌های اسید لاکتیک، گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، غیر اسپورزا و کروی یا میله‌ای شکل هستند که طی فرآیند تخمیر کربوهیدرات‌ها، اسید لاکتیک را به عنوان محصول نهایی تولید می‌کنند. تا به امروز چندین باکتری اسیدلاکتیک مختلف متعلق به جنس‌های لاکتوباسیلوس، لویکونستوک، ویسلا و پدیوکوکوس در این تخمیرها شناسایی شده‌اند [۲]. از عملکردهای مهم باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توان به تولید ترکیبات ضد میکروبی و ضد قارچی که باعث بهبود سلامت و افزایش ماندگاری محصول تولیدی می‌شوند و همچنین کاهش محتوای اسید فیتیک که سبب افزایش زیست دسترسی به مواد معدنی ضروری می‌گردد اشاره نمود [۳].

درخت بلوط، متعلق به خانواده فاگاسه و جنس کوئرکوس می‌باشد. میوه بلوط یکی از منابع غنی از کربوهیدرات، اسیدآمین، چربی و استرول‌های مختلف بوده و از گذشته در بسیاری از نقاط جهان در تهیه مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته است. در برخی از مناطق کشورمان مانند استان کهگیلویه و بویراحمد نیز از این میوه، آرد تهیه شده و در تهیه نان‌های سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. میوه بلوط، علاوه بر ترکیبات تغذیه‌ای دارای مقادیر قابل توجهی از ترکیبات زیست‌فعال بوده که از آن جمله می‌توان به

تانن، اسید گالیک، اسید الاجیک و مشتقات هگزاهایدروکسی دی‌فنوئیل اشاره کرد [۴]. ترکیبات موجود در بلوط، دارای اثرات سلامتی بخش نظیر خواص ضدویروسی، ضدباکتریایی، توانایی مهار و درمان برخی از خونریزی‌ها و درمان اسهال می‌باشند [۵]. کودا و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی بستره‌های تخمیری غلات و شبه‌غلات با هدف دستیابی به باکتری‌های اسید لاکتیک، حضور گونه‌هایی از لاکتوباسیلوس و پدیوکوکوس را در منابعی نظیر ارزن، سورگوم و آمارانت تأیید کردند [۶]. دمیرباس و همکاران (۲۰۱۷) نیز خصوصیات ضد میکروبی و عملکردی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از خمیر ترش را مطالعه نمودند. بنابر نتایج این محققین، اثرات مهارکنندگی مناسب برخی از این جدایه‌ها بر *آسپرژیلوس نایجر* مورد تأیید قرار گرفت. علاوه بر این، مشخص شد که این جدایه‌های لاکتیکی در برابر برخی از عوامل غذازاد دارای اثرات ضد باکتریایی متفاوتی بودند [۳]. اخیراً سکندر و همکاران (۲۰۱۸) ضمن مطالعه خصوصیات پروبیوتیکی جدایه‌های لاکتیکی چندین خمیر ترش محلی دریافتند که *اثروکوکوس مونادتی* در مقایسه با سایر سویه‌های تجزیه کننده گلوتن، دارای توانایی تحمل pH پایین، تحمل نمک صفرای و همچنین دارای خاصیت آگزیزی مناسبی در دیواره سلولی خود بود [۷].

بر اساس منابع موجود، تا کنون مطالعه‌ای در خصوص جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک حاصل از تخمیر آرد بلوط و همچنین ارزیابی ویژگی‌های بالقوه باکتری‌های جدا شده صورت نگرفته است. لذا این پژوهش به منظور ارزیابی قابلیت‌های پروبیوتیکی و ضد قارچی باکتری اسید لاکتیک غالب جدا شده از تخمیر آرد بلوط به اجرا در آمد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد اولیه

پس از حذف لایه‌های سخت بیرونی میوه بلوط توسط دستگاه پوست‌گیر سایشی، به وسیله دستگاه آسیاب غلتکی از آن آرد تهیه و در ادامه آرد تولیدی الک (مش ۴۵) گردید. سپس خصوصیات آرد تولیدی بر اساس روش‌های مدون (AOAC, 2002) تعیین گردید. محیط‌های کشت میکروبی از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

ثانیه ادامه یافت. در پایان، مرحله تکثیر انتهایی نیز به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (ترموسایکلر کوربت، مدل CGI-96، استرالیا) خاتمه پیدا کرد. در ادامه، به منظور شناسایی جدایه لاکتیکی، محصولات PCR پس از توالی‌یابی با استفاده از رویه Blast با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI هم‌ریف گردیدند [۱۰].

#### ۲-۴- مقاومت جدایه لاکتیکی به اسید و صفرا

برای این منظور، ابتدا جمعیت جدایه لاکتیکی به  $10^8$  CFU/mL (معادل نیم مک فارلند) تنظیم گردید. سپس pH محیط کشت MRS broth حاوی جمعیت باکتریایی مذکور با استفاده از اسید کلریدریک یک نرمال به حدود ۲ رسانده شد. در ادامه، سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس این سوسپانسیون میکروبی به مدت ۱/۵ ساعت در مجاورت غلظت ۰/۳ درصد نمک صفراوی و pH معادل ۶ قرار داده شد. در پایان زمان گرمخانه‌گذاری، رقت‌های متوالی از سوسپانسیون مذکور در رینگر استریل، تهیه و به صورت سطحی بر روی محیط کشت MRS agar کشت داده شد. نهایتاً تعداد باکتری زنده پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با نمونه شاهد (بدون تیمار اسید و صفرا) تعیین گردید [۱۱].

#### ۲-۵- اثرات ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی

برای بررسی خاصیت ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی در برابر اشرشیا کلی، استافیلوکوکس اورئوس، سالمونلا انتریکا و باسیلوس سرئوس به روش انتشار در دیسک، ابتدا جدایه لاکتیکی و باکتری‌های شاخص مذکور به ترتیب در محیط کشت‌های MRS broth و BHI broth در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس جمعیت جدایه لاکتیکی و شاخص‌های باکتریایی با جذب‌خوانی به  $10^8$  CFU/mL رسانده شد. در ادامه، هر یک از شاخص‌های باکتریایی به صورت سطحی بر روی پلیت جداگانه‌ای کشت داده شد. سپس دیسک‌های کاغذی استریل (پادتن طب، ایران) با فاصله معین از لبه پلیت در سطح محیط کشت حاوی باکتری‌های شاخص قرار داده شد و ۴۰ میکرولیتر از جدایه لاکتیکی بر روی دیسک‌های کاغذی منتقل گردید. نهایتاً پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

سویه‌های میکروبی مورد استفاده شامل اشرشیا کلی (*Escherichia coli* PTCC 1399)، استافیلوکوکس اورئوس (*Staphylococcus aureus* PTCC 1112)، سالمونلا انتریکا (*Salmonella enterica* PTCC 1709)، باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus* PTCC 1015) و آسپرژیلوس نایجر (*Aspergillus niger* PTCC 5012) نیز از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران، خریداری و سپس در محیط‌های کشت مناسب، فعال‌سازی گردید.

#### ۲-۲- تخمیر تصادفی آرد بلوط

پس از ترکیب آب و آرد بلوط و تولید خمیر با بازده ۲۰۰ (۱۰۰×نسبت خمیر به آرد = بازده خمیر)، مخلوط مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تخمیر گردید. برای رسیدن به فلور لاکتیکی غالب آرد بلوط تخمیر شده فرایند مایه‌گیری (افزودن قسمتی از تخمیر روز قبل به تخمیر تازه) تا رسیدن به pH حدود چهار تکرار گردید [۸].

#### ۲-۳- جداسازی و شناسایی باکتری اسید لاکتیک

##### غالب

سپس باکتری اسید لاکتیک غالب با تهیه رقت‌های متوالی و کشت سطحی آنها در محیط کشت اختصاصی agar MRS جداسازی و برای رسیدن به تک پرگنه خالص جدایه‌های لاکتیکی، از آنها کشت خطی تهیه گردید [۹]. در ادامه از تک پرگنه خالص جدایه لاکتیکی به دست آمده پس از انجام آزمون‌های کاتالاز و رنگ آمیزی گرم، DNA استخراج (بیونیر، AccuPrepK-3032، کره جنوبی) شد و توسط PCR دارای پرایمرهای F44 و R1543، تکثیر و سپس محصولات PCR، توالی‌یابی (شرکت بیونیر، کره جنوبی) گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر، شامل ده میکرو لیتر مخلوط واکنشگرهای آماده مصرف PCR (آمپلیکون، دانمارک)، ۱/۵ میکرو لیتر از هر پرایمر با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار، ۲ میکرو لیتر DNA با غلظت ۱۰۰ نانوگرم و ۵ میکرو لیتر آب دیونیزه انجام شد. در مرحله اول تکثیر، واسرشت DNA با شروع داغ در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، آغاز گشته و طی ۳۵ چرخه با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰

به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند. قطر هاله عدم رشد نیز با استفاده از نرم افزار (نسخه 1.4.3.67) Image J اندازه‌گیری شد [۱۲].

## ۲-۶- اثرات ضد باکتریایی رومانند فاقد سلول جدایه لاکتیکی

برای بررسی خاصیت ضد باکتریایی رومانند فاقد سلول جدایه لاکتیکی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی انتخابی (که بیشترین اثر بازدارنده جدایه لاکتیکی در مرحله قبل در برابر آنها مشاهده شده بود) به روش ریز رقت، جمعیت باکتری‌های شاخص مورد استفاده به  $10^8$  CFU/mL رسانیده شد. سپس اثر رومانند فاقد سلول خام‌وخشی شده جدایه لاکتیکی، بر روی آنها بررسی گردید. برای تهیه رومانند فاقد سلول خام، کشت ۲۴ ساعته جدایه لاکتیکی با  $14000$  دور در دقیقه، دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ (سانتریفوژ یخچال‌دار، مدل 3k30Sigma، آلمان) گردید. سپس مایع رویی به دست آمده از فیلتر سرنگی (جت بیوفیل، چین)  $0/45$  میکرونی عبور داده شد. برای تهیه رومانند فاقد سلول خشی شده جدایه لاکتیکی نیز  $pH=7.5$  رومانند فاقد سلول خام تهیه شده با سود یک نرمال تا  $pH=7.5$  خشی گردید. در این آزمایش، نمونه کنترل منفی، شامل مخلوط ۱۸۵ میکرولیتر رومانند فاقد سلول خام و ۱۵ میکرولیتر از هر یک از شاخص‌های باکتریایی اتوکلاو شده و نمونه کنترل مثبت نیز شامل مخلوط ۱۸۵ میکرولیتر محیط کشت و ۱۵ میکرولیتر شاخص باکتریایی بودند. همچنین در چاهک مربوط به رومانند فاقد سلول خام و خشی شده، مقدار ۱۸۵ میکرولیتر از هر رومانند و ۱۵ میکرولیتر از شاخص باکتریایی مورد نظر اضافه گردید. سرانجام این میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و سپس توسط دستگاه خوانشگر میکروپلیت (SCO MPR01، آلمان) در طول موج ۶۲۰ نانومتر جذب‌سنجی صورت گرفت [۱۲].

## ۲-۷- قابلیت خود اتصالی و دگر اتصالی جدایه

### لاکتیکی

برای ارزیابی خاصیت دگر اتصالی جدایه لاکتیکی با اشرشیاکلی (عامل عفونی روده)، سلول‌های حاصل از کشت ۲۴ ساعته جدایه لاکتیکی توسط سانتریفوژ یخچال‌دار، جدا و دو بار توسط بافر فسفات، شستشو داده شد. سپس مخلوط دارای حجم‌های مساوی از سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و سوسپانسیون باکتری شاخص مورد نظر تهیه گردید. جذب نوری سوسپانسیون‌های مذکور نیز پس از ۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد (اسپکتروفوتومتر PG اینسترومنتز، انگلستان) و بر اساس رابطه ذیل، میزان خاصیت دگر اتصالی محاسبه گردید. در این رابطه  $A_p$  جذب سوسپانسیون باکتری شاخص،  $A_{lac}$  جذب سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و  $A_{mix}$  جذب مخلوط سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و باکتری شاخص می‌باشد.

$$100 * [(A_p + A_{lac}) / 2 - (A_{mix}) / (A_p + A_{lac}) / 2]$$

برای ارزیابی قابلیت خود اتصالی نیز چهار میلی‌لیتر از سوسپانسیون جدایه لاکتیکی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری و جذب نوری سوسپانسیون در زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانش و سپس میزان قابلیت خوداتصالی بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید. در این رابطه  $A_t$  مقدار جذب ۲۴ ساعته و  $A_0$  مقدار جذب در ساعت صفر است [۱۳].

$$100 * [1 - (A_t / A_0)]$$

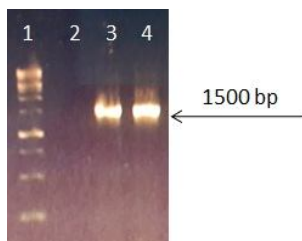
## ۲-۸- مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه لاکتیکی

مقاومت جدایه لاکتیکی در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج نیز با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بررسی گردید. ابتدا ۲۰۰ میکرو لیتر از کشت ۲۴ ساعته جدایه لاکتیکی به ۴ میلی‌لیتر محیط کشت MRS حاوی یک درصد آگار (دمای ۴۵ درجه سانتی-گراد) افزوده شد و سپس بر سطح پلیت‌های از پیش آماده شده حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت MRSagar 1/5 درصد جامد شده، تلقیح گردید. در ادامه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بر روی سطح این پلیت‌ها قرار گرفت و پلیت‌های مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. در پایان زمان گرمخانه‌گذاری با توجه به قطر هاله عدم رشد کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر (مقاوم)، ۱۵ تا ۱۹ میلی‌متر (حساسیت

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- شناسایی باکتری اسید لاکتیک غالب

آرد بلوط مورد استفاده در این پژوهش، دارای ۵/۷ درصد چربی، ۶/۴ درصد پروتئین، ۶/۸ درصد کربوهیدرات و ۸/۳ درصد رطوبت بود. همچنین پس از ۴ بار تکرار فرایند مایه گیری، pH خمیر آرد بلوط به حدود چهار رسید و باکتری اسید لاکتیک غالب با روشی که قبلاً توضیح داده شد جدا گردید. بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و مورفولوژی، جدایه لاکتیکی غالب، یک باکتری گرم مثبت، کاتالاز منفی و کروی شکل بود. ژل الکتروفورز محصولات PCR نیز منجر به تایید تکثیر اختصاصی توالی هدف ۱۵۰۰ جفت‌بازی در DNA ژنومی جدایه لاکتیکی در مقایسه با نمونه کنترل منفی (فاقد DNA) و کنترل مثبت (DNA استخراج شده از سویه کلکسیونی) شد (شکل ۱). سرانجام بر اساس نتایج توالی‌یابی محصولات PCR و هم‌ردیفی آنها با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI جدایه لاکتیکی، پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی (۹۸ درصد تشابه) شناسایی گردید.



**Fig 1** Gel electrophoresis of the PCR products. Lane 1: DNA ladder, lane 2: negative control, lane 3: positive control and lane 4: amplified DNA of the LAB isolate.

لاتانزی و همکاران در سال ۲۰۱۳ با هدف دستیابی به باکتری‌های اسید لاکتیک، مطالعاتی بر روی ۱۸ نمونه خمیرترش ایتالیایی انجام دادند که طی این مطالعات حضور جنس پدیوکوکوس تأیید شد [۱۷]. رابرت و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ تنوع زیستی باکتری‌های اسید لاکتیک خمیرترش‌های فرانسوی را بررسی کردند که نشان دهنده حضور ۳۸ درصدی جنس پدیوکوکوس بود [۱۸]. دمیرباس و همکاران (۲۰۱۷) با مطالعه باکتری‌های

نسبی) و بیشتر از ۲۰ میلی‌متر (حساس)، مقاومت جدایه‌های لاکتیکی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد ارزیابی تعیین شد [۱۴].

#### ۲-۹- قابلیت همولیز خون توسط جدایه لاکتیکی

برای این منظور، جدایه لاکتیکی بر روی سطح محیط کشت Blood agar حاوی ۵ درصد خون گوسفندی، کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ایجاد هاله و تغییر رنگ در محیط کشت بررسی گردید [۱۵].

#### ۲-۱۰- اثر ضد قارچی جدایه لاکتیکی

برای ارزیابی اثر ضد قارچی جدایه لاکتیکی از روش کشت دو لایه در برابر اسپرژیلوس نایجر (یک شاخص قارچی غذازاد) استفاده گردید. در این روش از کشت فعال جدایه لاکتیکی با استفاده از سوآب، خطوطی به اندازه سه سانتی‌متر با فاصله متناسب از یکدیگر در مرکز پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS agar کشیده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه‌گذاری شد. سپس از مخلوط سوسپانسیون اسپور قارچ شاخص با جمعیت  $(10^8 \text{ spore/mL})$  به همراه محیط کشت YGC agar بر روی خطوط کشت داده شده جدایه لاکتیکی به صورت کشت دولایه، ریخته و پس از انعقاد لایه دوم، پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سرانجام قطر هاله عدم رشد قارچ در اطراف خطوط کشت داده شده جدایه لاکتیکی تعیین گردید [۱۶].

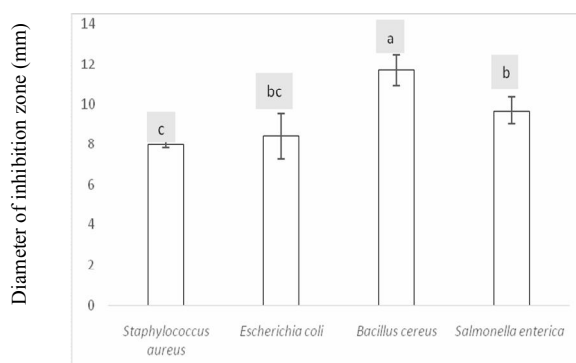
#### ۲-۱۱- آنالیز آماری نتایج

نتایج حاصل از این پژوهش در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شده و برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۰) و برای ترسیم نمودارها از Microsoft Office Excel 2016 استفاده گردید. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح  $P < 0.05$  انجام گرفت.

بakterی‌های اسید دوست در pHهای پایین‌تر از محدوده رشدشان، ترکیبات اسیدی محیط را به وسیله آنزیم‌های دکربوکسیلاز، هیدرولیز کرده و pH محیط را تعدیل می‌کنند. علاوه بر این، اثر محافظتی ماتریکس غذایی و تأثیر هیدرولیز نمک‌های صفاوی در مقاومت باکتری‌ها نسبت به نمک صفاوی موثر است [۲۳].

### ۳-۳- اثرات ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود اثر بازدارنده پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی جدا شده بر روی باسیلوس سرئوس به شکل معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) از سایر شاخص‌های باکتریایی غذازاد بیشتر بود. همچنین قطر هاله عدم رشد سالمونلا اتریکا بیشتر از اشرشیا کلی بود اما اختلاف معنی‌داری بین میزان رشد آن‌ها تحت تأثیر جدایه لاکتیکی وجود نداشت. علاوه بر این، قطر هاله عدم رشد اشرشیا کلی در حضور جدایه لاکتیکی بیشتر از استافیلوکوکوس اورئوس بود اما بین اثر ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی بر اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.



**Fig 2** Diameter of inhibition zone of the indicator bacteria in present of the LAB isolate in disc diffusion assay. The different letters show significant difference at  $P < 0.05$ .

طی مطالعات سیمسک و همکاران در سال ۲۰۰۶ مشخص شد که جدایه پدیوکوکوس بر روی باسیلوس سوبتیلیس، لیستریامونوسیتوزنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی اثر بازدارندگی دارد [۲۴]. دیویا و همکاران در سال ۲۰۱۲ طی تحقیقاتی نشان دادند که ویسلا سیاریا بر روی باکتری‌های

اسید لاکتیک جدا شده از خمیرترش، گونه‌هایی از لاکتوباسیلوس، لویکونستوک و ویسلا را شناسایی کردند [۳].

عواملی همچون سویسترا و شرایط تخمیر شامل دما، زمان و بازده خمیر در تنوع میکروبی جدایه‌های لاکتیکی غالب موجود در خمیرترش موثر هستند. سویستراهای مختلف، امکان دستیابی به باکتری‌های اسید لاکتیک متفاوت را فراهم می‌آورند. همچنین میزان فعالیت آبی بستره تخمیری، نقش مستقیمی در تعیین فلور میکروبی غالب در خمیرترش دارد. از این رو بازده خمیر که نشان دهنده میزان فعالیت آبی خمیر می‌باشد از عوامل مهم و تأثیرگذار در تنوع زیستی باکتری‌های موجود در خمیرترش است. علاوه بر این، تکرار فرایند مایه‌گیری با حفظ بخشی از جمعیت اولیه طی تخمیرهای متوالی در دستیابی به جمعیت غالب نقش بسزایی دارد [۱۹].

### ۳-۲- مقاومت به اسید و صفرا

نتایج ارزیابی مقاومت جدایه لاکتیکی به تیمار متوالی اسید و صفرا نشان داد که پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی جدا شده در  $1/41 \pm 72/78$  درصد زنده‌مانی خود ( $6/23 \log CFU/mL$ ) را در مقایسه با نمونه کنترل ( $8/56 \log CFU/mL$ ) در این شرایط حفظ نمود.

آنگمو و همکاران طی پژوهشی در سال ۲۰۱۶ زنده‌مانی باکتری‌های اسید لاکتیک از جمله لاکتوباسیلوس پلانتروم را در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش تأیید کردند [۱۵]. ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۷) نیز با مطالعه بر روی جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو دریافتند که جدایه‌های مورد بررسی به ویژه لاکتوباسیلوس برویس و پدیوکوکوس پنتازسئوس توانایی زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش را داشتند [۲۰]. میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک برای بقاء و ایجاد تأثیرات مثبت خود در بدن باید شرایط دستگاه گوارش را تحمل کنند. به همین علت از زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در شرایط مشابه دستگاه گوارش به عنوان یکی از مهم‌ترین معیارهای گزینش آنها استفاده می‌شود [۲۱]. زنده‌مانی برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک در pH پایین، می‌تواند به علت تولید ترکیباتی نظیر پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی باشد که مانع از اثر اسید بر روی غشای سلولی باکتری‌های مذکور می‌گردند [۲۲]. همچنین

## ۳-۴- اثر ضد باکتریایی رومانند فاقد سلول

## جدایه لاکتیکی

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود بین خاصیت ضد باکتریایی رومانند فاقد سلول خام و رومانند فاقد سلول خنثی شده حاصل از کشت پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی بر روی باکتری‌های غذازاد، تفاوت معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) مشاهده شد. بر این اساس، اثر بازدارنده رومانند فاقد سلول خام و خنثی شده بر روی باسیلوس سرئوس به شکل معنی‌داری بیشتر از سالمونلا اتتریکا بود و همچنین رومانند فاقد سلول خام نسبت به رومانند خنثی شده بر روی هر دو باکتری مذکور اثر بازدارنده بیشتری داشت ( $P < 0.05$ ). همچنین پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، باسیلوس سرئوس تحت تأثیر رومانند فاقد سلول خام، فاقد رشد بود اما تحت تأثیر رومانند فاقد سلول خنثی شده، رشد اندکی از خود نشان داد. رومانند فاقد سلول خنثی شده جدایه لاکتیکی نیز بر خلاف رومانند فاقد سلول خام، هیچ تاثیری بر رشد سالمونلا اتتریکا نداشت.

**Table 1** Inhibition percentage of indicator bacteria in present of crude and naturalized CFS (cell free supernatant) obtained from LAB culture. Different lowercase and uppercase letters show significant difference at  $P < 0.05$  for each row and column, respectively.

Foodborne indicator bacteria		
<i>Salmonella enterica</i>	<i>Bacillus cereus</i>	Cell Free Supernatant (CFS)
$69.36 \pm 0.49^{Ab}$	$100 \pm 0^{Aa}$	Crude CFS
$0 \pm 0^{Bb}$	$5.24 \pm 1.58^{Ba}$	Naturalized CFS

باکتری‌های اسید لاکتیک طی خنثی‌سازی به وسیله سود کاهش می‌یابد [۲۹].

علت اثر ضد میکروبی رومانند فاقد سلول خام پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی بر روی باسیلوس سرئوس می‌تواند مربوط به اسیدهای آلی و یا سایر متابولیت‌های ضد میکروبی نظیر باکتریوسین‌ها باشد که در pHهای اسیدی، فعال هستند. در حالیکه اثر ضد میکروبی رومانند مذکور بر روی سالمونلا/اتتریکا را می‌توان تنها به اسیدهای آلی نسبت داد زیرا با خنثی شدن رومانند فاقد سلول، هیچ گونه اثر بازدارندگی مشاهده نشد. اثر بازدارنده باکتریوسین‌ها عمدتاً به واسطه مانع از فعالیت آنزیم‌های DNA gyrase، RNA پلیمراز، tRNA سنتتاز، تداخل در سنتز لیپید II در دیواره سلولی باکتری‌ها و همچنین ایجاد شکاف

استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی تأثیر بازدارندگی داشت [۲۵]. همچنین هلادیکووا و همکاران طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ بر روی خاصیت ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک کروی شکل دریافتند که پدیوکوکوس پتتوزاسئوس بر روی باسیلوس سوتیلیس، اشرشیاکلی، لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس اثر آنتاگونیستی داشت [۲۶]. بر اساس مطالعات آنگمو و همکاران (۲۰۱۶) یکی از زیرگونه‌های لاکتوباسیلوس پلانتروم دارای اثر مانع‌کننده برابر باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس و شیگلا دیسانتری بود و زیرگونه دیگری از لاکتوباسیلوس پلانتروم اثر مانع‌کنندگی ضعیفی در برابر اشرشیاکلی از خود نشان داد. مهم‌ترین مکانیسم‌های موثر در خاصیت ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک شامل رقابت در جذب مواد مغذی، تولید اسیدهای آلی و کاهش pH، تولید سایر ترکیبات ضد میکروبی و اثر متقابل بین اسیدهای آلی و سایر متابولیت‌های ضد میکروبی است [۱۵].

مطالعات سیزیکین و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داد که متابولیت‌های تولید شده به وسیله پدیوکوکوس پتتازاسئوس و پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی دارای خاصیت بازدارندگی بر روی باسیلوس سوتیلیس، لیستریا مونوسیتوژنز و اشرشیاکلی بودند [۲۷]. همچنین طی مطالعات اوگانانو و همکاران (۲۰۰۳) مهارکنندگی رومانند فاقد سلول حاصل از کشت لاکتوباسیلوس برویس جدا شده از خمیرترش، در برابر شاخص‌های باکتریایی باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس فکالیس، لیستریا مونوسیتوژنز، اشرشیاکلی و سالمونلا تایفی‌موریوم تأیید شد [۲۸]. تارماراج و شاه (۲۰۰۹) گزارش دادند که اثر مهارکنندگی رومانند فاقد سلول

استرپتومایسین، سفتریاکسون، اسید نالیدیکسیک، ونکومایسین و سیپروفلوکساسین، مقاوم بود اما نسبت به سفازولین، سفالوتین، پنی سیلین و آمپی سیلین، حساسیت نشان داد.

**Table 2** Resistance of the LAB isolate towards some routine antibiotics determined based on disc diffusion bioassay.

Relative resistance	Antibiotic ( $\mu\text{g}$ )
Resistant	Streptomycin (10)
Resistant	Ceftriaxone (30)
Resistant	Nalidixic acid (30)
Resistant	Vancomycin (30)
Resistant	Cefazolin (30)
Susceptible	Cefazolin (30)
Susceptible	Cephalothin (30)
Susceptible	penicillin (10)
Semi resistant	Imipenem (10)
Susceptible	Ampicillin (10)

آنگمو و همکاران در سال ۲۰۱۶ با بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک، گزارش کردند که بیشتر جدایه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین، کلیندامایسین، کوتریماکسازول، اریترومایسین و آمپی سیلین، حساس و همچنین نسبت به ونکومایسین، مقاوم بودند [۱۵]. در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۱۶ توسط لی و همکاران انجام شد مشخص گردید که جدایه‌های لاکتیکی مورد مطالعه به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین، اریترومایسین، کلرامفنیکل و سیکلوهاگزامید، حساسیت داشته و در برابر ونکومایسین، مقاوم بودند [۳۲]. با توجه به اینکه باکتری‌های بیماری‌زا هر روزه مقاومت بیشتری در برابر آنتی بیوتیک‌ها از خود نشان می‌دهند لذا بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری‌های پروبیوتیک از منظر ایمنی مصرف کننده، امری ضروری می‌نماید. عموماً باکتری‌های اسید لاکتیک پروبیوتیک مربوط به جنس‌های لاکتوباسیلوس، لویکونوستوک، پدیوکوکوس و استرپتوکوکوس به آنتی بیوتیک‌های رایج حساس هستند در حالی که برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک به سبب فقدان سیتوکروم‌های ناقل الکترون و همچنین نفوذناپذیری غشاء سیتوپلاسمی به آمینوگلیکوزیدها و کوئینولون‌ها مقاوم هستند. علاوه بر این، برخی از کوکسی‌های گرم مثبت در برابر کوئینولون‌ها از خود مقاومت نشان می‌دهند که علت این امر را با

در آن بروز می‌نماید. علاوه بر این، معمولاً این متابولیت‌ها در شرایط اسیدی از نفوذپذیری بیشتری برخوردار می‌باشند [۲۴].

### ۳-۵- قابلیت خود اتصالی و دگر اتصالی جدایه

#### لاکتیکی

میزان قابلیت خود اتصالی جدایه لاکتیکی معادل ۵۵/۴۶ درصد و میزان قابلیت دگر اتصالی آن با *اشرشیا کلی* نیز معادل ۳۱/۰۰ درصد بود.

طی مطالعات کولادو و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی میزان قابلیت خود اتصالی و دگر اتصالی لاکتوباسیلوس پلانتروم، میزان قابلیت خود اتصالی این باکتری پس از دو ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۲۱/۷ درصد و میزان قابلیت دگر اتصالی آن با *استافیلوکوکوس اورئوس* بعد از چهار ساعت گرمخانه‌گذاری، ۲۲/۹ درصد گزارش شد [۳۰]. همچنین لاکتوباسیلوس پلانتروم در مطالعات آنگمو و همکاران (۲۰۱۶) نیز با قابلیت خود اتصالی ۷۳ درصد، بیشترین میزان خود اتصالی را نسبت به سایر جدایه‌های لاکتیکی مورد مطالعه داشت [۱۵]. توانایی اتصال در باکتری‌های پروبیوتیک به دو شکل خود اتصالی (اتصال به باکتری‌های هم نوع) و دگر اتصالی (اتصال به سایر باکتری‌ها) قابل مطالعه است. اتصال به باکتری‌های هم نوع، باعث اتصال پروبیوتیک‌ها به سلول‌های اپی‌تلیال روده، تجمع و محافظت از دستگاه گوارش و همچنین اتصال به باکتری‌های متفاوت، باعث واکنش باکتری‌های اسید لاکتیک با باکتری‌های بیماری‌زا و جلوگیری از لانه‌گزینی آنها در دستگاه گوارش می‌گردد. عامل اصلی در این اتصال، پروتئین‌های سطح باکتری‌های اسید لاکتیک و اسیدهای تیکوئیک هستند و شروع این واکنش به ویژگی آبگریزی دیواره سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک بستگی دارد. آبگریزی سطحی سلول به عنوان یک عامل فیزیکوشیمیایی، سبب ایجاد اتصال این باکتری‌ها به پوشش دستگاه گوارش از یک سو و اتصال به باکتری‌های بیماری‌زا از سوی دیگر می‌گردد. خاصیت آبگریزی دیواره سلولی در باکتری‌های اسید لاکتیک، یکسان نبوده و بسته به جنس و نژاد آنها متفاوت می‌باشد [۳۱].

### ۳-۶- مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه لاکتیکی

بر اساس نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی که در جدول ۲ نشان داده شده است، جدایه لاکتیکی نسبت به آنتی بیوتیک‌های



درصد رشد قارچ را کاهش داده و از اسپورزایی (ایجاد رنگ سیاه) آن نیز ممانعت نماید.



**Fig 3** Antifungal effect of the LAB isolate on *A. niger* after 4 incubation day, in comparison with the control plate in overlay bioassay.

مانینی و همکاران (۲۰۱۶) طی مطالعه‌ای که بر روی باکتری‌های اسیدلاکتیک حاصل از تخمیر سبوس گندم داشتند، اثرات ضد قارچی این باکتری‌ها را تأیید کردند [۳۶]. همچنین طی تحقیقات کودا و همکاران (۲۰۱۱) نه پپتید ضد قارچی جدید از لاکتوباسیلوس پلانناروم خالص‌سازی و شناسایی شد [۲]. خاصیت ضد قارچی باکتری‌های اسید لاکتیک را می‌توان به اثر متابولیت‌های تولیدی توسط آنها شامل اسیدهای آلی، اسیدهای چرب و همینطور دی‌پپتیدهای حلقوی و ترکیبات فعال نظیر ۴-هیدروکسی فنیل پروپانویک اسید، فنیل پروپانویک اسید و فنیل لاکتیک اسید بر روی جوانه‌زنی و رشد قارچ‌ها مرتبط دانست [۱۶]. اسیدی کردن سیتوپلاسم و کاهش pH به سطح پایین‌تر از محدوده رشد قارچ‌ها و همچنین اختلال در شیب پروتونی غشاء از جمله مکانیسم‌های ضد قارچی اسیدهای آلی تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک هستند. اسیدهای چرب نیز با تغییر ماهیت غشاء از طریق تفکیک لایه‌های چربی آن، از رشد قارچ‌ها جلوگیری می‌کنند. همچنین در برخی از پپتیدهای ضد قارچی، ساختارهای مارپیچ حاوی گروه‌های آبگریز سطحی وجود دارند که مانع از رشد قارچ‌ها می‌شوند [۲].

#### ۴- نتیجه گیری

بررسی خصوصیات باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از بسترهایی که تا کنون کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند احتمال

وقوع جهش در ژن‌های ویژه‌ای از آنها تحت تیمار آنتی‌بیوتیکی مرتبط می‌دانند. اگرچه غالباً ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در ژنوم غیر کروموزومی باکتری‌ها قرار دارد اما در برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک این ژن در نواحی حفاظت شده نیز مشاهده می‌شود. استفاده از این باکتری‌ها در فرآورده‌های غذایی، برای جبران فلور میکروبی از دست رفته دستگاه گوارش به واسطه مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها حائز اهمیت است [۳۳]. به دلیل عملکرد ویژه و نکومایسین در برابر عفونت‌های شدید و مقاوم به داروهای ترکیبی، مقاومت پروبیوتیک‌ها به این آنتی‌بیوتیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از دلایل مقاومت برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک به و نکومایسین می‌توان به وجود اسید آمینه انتهایی D-آلانین به جای D-لاکتات یا D-سرین در این باکتری‌ها اشاره کرد [۳۴].

#### ۳-۷- قابلیت همولیز خون

جدایه لاکتیکی مورد مطالعه، فاقد فعالیت همولیزی بود. فعالیت همولیزی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از بستره‌های تخمیری مورد مطالعه آنگمو و همکاران (۲۰۱۶) نیز منفی گزارش شد [۱۵]. همچنین جدایه‌های لاکتوباسیلوس پلانناروم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس که توسط کالوئی و همکاران (۲۰۱۰) مورد مطالعه قرار گرفتند، فاقد فعالیت همولیزی بودند [۳۵]. سه نوع فعالیت همولیزی آلفا، بتا و گاما در باکتری‌ها وجود دارد. در همولیز نوع آلفا، هاله سبز و در همولیز نوع بتا، هاله زرد رنگ در محیط کشت خوندار دیده می‌شود اما طی همولیز نوع گاما، تغییر رنگی در محیط کشت دیده نمی‌شود. عموماً فعالیت‌های آنزیمی همچون فعالیت کواگولازی با همولیز خون، مرتبط هستند. به دلیل امکان اختلال در لایه‌های اپی‌تلیال روده در صورت فعالیت همولیزی باکتری‌ها، عدم فعالیت همولیزی در آنها برای مصارف انسانی اهمیت ویژه‌ای دارد [۱۵].

#### ۳-۸- اثر ضد قارچی جدایه لاکتیکی

اثر ضد قارچی پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی بر روی آسپرژیلوس نایجر پس از چهار روز گرمخانه‌گذاری در مقایسه با پلیت کنترل (فاقد جدایه لاکتیکی و حاوی اسپور قارچ) در شکل ۳ نشان داده شده است. بر این اساس، جدایه لاکتیکی توانست  $3/50 \pm 2/40$

- [5] Majzooobi, M., Mortazavi, S. H., Asadi Yousefabad, S. H., & Farahnaki, A. (2013). The effect of acorn flour on Characteristics of dough and Barbari bread. *Research in Science and Food Industry*, 23(2), 271-280.
- [6] Coda, R., Di Cagno, R., Gobbetti, M., & Rizzello, C. G. (2014). Sourdough lactic acid bacteria: exploration of non-wheat cereal-based fermentation. *Food Microbiology*, 37, 51-58.
- [7] Sakandar, H. A., Usman, K., & 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.
- [8] Habibi Najafi, M. B., Pourfarzad, A., Zahedi, H., Ahmadian, Kouchaksaraie, Z., & Haddad Khodaparast, M. H. (2016). Development of sourdough fermented date seed for improving the quality and shelf life of flat bread: study with univariate and multivariate analyses. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (1), 209-220.
- [9] Sadeghi, A., Raeisi, M., Ebrahimi, M., & Sadeghi, B. (2016). Antifungal activity of *Pediococcus pentosaceus* isolated from whole barley sourdough. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 3(1), 30-36.
- [10] Abnous, K., Brooks, S. P., Kwan, J., Matias, F., Green-Johnson, J., Selinger, L. B., ...& 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.
- [11] Rolim, F. R. L., dos Santos, K. M. O., de Barcelos, S. C., do Egito, A. S., Ribeiro, T. S., da Conceição, M. L., ...& do Egypto, R. D. C. R. (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.
- [12] Lavermicocca, P., Valerio, F., & Visconti, A. (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 634-640.

مواجهه با خصوصیات جالب توجهی را در پی خواهد شد. بر اساس منابع موجود، تاکنون گزارشی در خصوص جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از بلوط تخمیر شده و همچنین ارزیابی ویژگی‌های بالقوه آنها صورت نگرفته است. در این پژوهش، ارزیابی خصوصیات پدیوکوکوس اسیدی لاکتیزی به عنوان جدایه لاکتیکی غالب بلوط تخمیر شده نشان داد که این جدایه از قابلیت‌های پروبیوتیکی و ضد قارچی مناسبی برخوردار می‌باشد. با توجه به زنده‌مانی مناسب این جدایه در شرایط اسیدی و حضور نمک‌های صفراوی، اثرات ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی و رومانند فاقد سلول آن، قابلیت‌های خود اتصالی و دگر اتصالی و همچنین ایمنی و اثر ضد قارچی جدایه پدیوکوکوس اسیدی لاکتیزی می‌توان آن را به عنوان یک نامزد مناسب جهت استفاده به عنوان کشت میکروبی پروبیوتیک و ضد قارچ در صنایع تخمیری معرفی نمود.

## ۵-منابع

- [1] Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241.
- [2] Coda, R., Cassone, A., Rizzello, C. G., Nionelli, L., Cardinali, G., & Gobbetti, M. (2011). Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. *Applied and Environmental Microbiology* 77(10), 3484-3492.
- [3] Demirbaş, F., İspirli, H., Kurnaz, A. A., Yilmaz, M. T., & Dertli, E. (2017). Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 361-366.
- [4] Rakic, S., Povrenovic, D., Tesevic, V., Simic, M., & Maletic, R. (2006). Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food. *Journal of Food Engineering*. 74(3). 416-423.

- yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, 15(12), 1289-1297.
- [22] Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9-10), 895-904.
- [23] Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197-215.
- [24] Şimşek, Ö., Çon, A. H., & Tulumog˘lu, Ş. (2006). Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. *Food Control*, 17(4), 263-270.
- [25] Divya, J. B., Varsha, K. K., & Nampoothiri, K. M. (2012). Newly isolated lactic acid bacteria with probiotic features for potential application in food industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(5), 1314-1324.
- [26] Hladíková, Z., Smetanková, J., Greif, G., & Greifová, M. (2012). Antimicrobial activity of selected lactic acid cocci and production of organic acids. *Acta Chimica Slovaca*, 5(1), 80-85.
- [27] 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.
- [28] Ogunbanwo, S. T., Sanni, A. I., & Onilude, A. A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*, 2(8), 219-227.
- [29] 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.
- [30] Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1065-1073.
- [13] Zhang, Y., Zhang, L., Du, M., Yi, H., Guo, C., Tuo, Y., ...& Yang, L. (2011). Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiological Research*, 167(1), 27-31.
- [14] Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2006). Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111(3), 234-240.
- [15] Angmo, K., Kumari, A., & 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.
- [16] Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., & Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219(1), 129-135.
- [17] Lattanzi, A., Minervini, F., Di Cagno, R., Diviccaro, A., Antonielli, L., Cardinali, G., ...& Gobbetti, M. (2013). The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2-3), 71-79.
- [18] Robert, H., Gabriel, V., & Fontagné-Faucher, C. (2009). Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 135(1), 53-59.
- [19] Chavan, R. S., & Chavan, S. R. (2011). Sourdough technology—a traditional way for wholesome foods: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(3), 169-182.
- [20] Ebrahimi, M., Sadeghi, A., & Sadeghi, B. (2017). Phylogenetic relationship and probiotic properties of dominant lactic acid bacteria isolated from whole barley sourdough. *Journal of Food Microbiology*, 4, 57-70.
- [21] Schillinger, U., Guigas, C., & Holzapfel, W. H. (2005). In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic

- [34] Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2015). Quantitative proteomic view associated with resistance to clinically important antibiotics in Gram-positive bacteria: a systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 6, 828.
- [35] Kalui, C. M., Mathara, J. M., & Kutima, P. M. (2010). Probiotic potential of spontaneously fermented cereal based foods—A review. *African Journal of Biotechnology*, 9(17), 2490-2498.
- [36] Manini, F., Casiraghi, M. C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., & Plumed-Ferrer, C. (2016). Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 275-283.
- [31] Grześkowiak, Ł., Collado, M. C., Vesterlund, S., Mazurkiewicz, J., & Salminen, S. (2011). Adhesion abilities of commensal fish bacteria by use of mucus model system: quantitative analysis. *Aquaculture*, 318(1-2), 33-36.
- [32] Lee, K. W., Shim, J. M., Park, S. K., Heo, H. J., Kim, H. J., Ham, K. S., & Kim, J. H. (2016). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 130-137.
- [33] Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 730-739.



## Evaluation of probiotic and antifungal properties of the predominant LAB isolated from fermented acorn (*Quercus persica*)

Purabdollah, H.<sup>1</sup>, Sadeghi, A.<sup>1\*</sup>, Ebrahimi, M.<sup>2</sup>, Kashaninejad, M.<sup>1</sup>,  
Shahiri Tabarestani, H.<sup>1</sup>, Mohamadzadeh, J.<sup>3</sup>

1. Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. Food, Drug and Natural Products Health Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.
3. Agricultural Engineering Research Department, Golestan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Gorgan, Iran.

### ABSTRACT

Characterization of lactic acid bacteria (LAB) isolated from rarely studied fermentation substrates can lead to isolate unique microorganisms. In the present study, predominant LAB was isolated from fermented acorn using repeat of back-slopping process, and then the isolate was identified by PCR. Subsequently, probiotic properties of the isolate (including resistance to acid and bile, antibacterial, auto and co-aggregations, antibiotic susceptibility and blood hemolysis), as well as its antifungal effect were studied. Sequencing results of the PCR products led to the identification of *Pediococcus acidilactici* as predominant LAB isolate. The survival percentage of the isolate in continuous acid and bile treatment was equal to 72%. The inhibitory effect of the isolate on *Bacillus cereus* was also significantly ( $P < 0.05$ ) higher than the other foodborne indicator bacteria. Furthermore, crude cell free supernatant (CFS) obtained from LAB culture completely inhibit the growth of *B. cereus*; meanwhile, its naturalized CFS had no inhibitory effect on *Salmonella enterica*. LAB isolate had also proper auto and co-aggregation (with *E. coli*) potentials and had no hemolytic activity. Antifungal activity of the isolate against *Aspergillus niger* was also verified. By considering the proper probiotic and antifungal potentials of the *P. acidilactici* isolated from fermented acorn it is possible to use the isolate as microbial starter, adjunct, probiotic and or protective culture in fermentation industries.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 2019/06/17  
Accepted 2019/09/22

#### Keywords:

Fermented acorn,  
Predominant LAB isolate,  
Probiotic properties,  
Cell free supernatant.

DOI: 10.52547/fsct.19.124.171

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.124.1.8

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