Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Isolation and Identification of Predominant Lactic Acid Bacterial Flora From Oat Bran Sourdough and Their Antifungal Ability

Tahereh Masoomshahi[1], Jalal Ehsani[1*], Maryam Ebrahimi[1]

1. *Food, Drug, Natural Products Health Research Centre, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran*

10.30699/ijmm.14.5.408

ABSTRACT

Background: The widespread consumption of industrial fermented products instead of traditional products leads to the loss of various lactic acid bacteria (LAB), especially the strains producing bioactive compounds. The present study aimed to isolate and molecularly identify LAB and investigate their antifungal impact on *Aspergillus niger* growth.

Materials & Methods: Oat bran was purchased from the Gorgan city market in 2019 and sourdough was prepared. Afterwards, bacteria were isolated and identified in the Microbiology Laboratory of Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. Next, the antifungal activity of LAB and their supernatant against *A. niger* was investigated. Finally, the identification of the cell-free supernatant of LAB was completed using gas chromatography-mass spectrometry.

Results: Findings of the current study demonstrated that *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus sakei* had the highest inhibitory effects of 30.25% and 18.47% against *A. niger*, respectively. Moreover, the minimum inhibitory concentration of *L. brevis* and *L. sakei* supernatants against *A. niger* was found as 3%. We observed that the greater effect of the supernatant of *L. brevis* could be due to the presence of ester, phenolic, and barbiturate compounds.

Conclusion: According to our results, dominant LAB from oat bran sourdough, as well as their cultured pellets have suitable antifungal potential against *A. niger*. Therefore, these bacteria can be used as a starter culture or co-culture in the fermentation products process, such as sourdough to decrease fungal contamination.

Keywords: Antifungal effect, Lactic acid bacteria, Sourdough

Received: 2019/11/05; **Accepted**: 2020/05/15; **Published Online:** 2020/09/26

Corresponding Information: **Jalal Ehsani,** Food, Drug, Natural Products Health Research Centre, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. Email: jalal.ehsani@gmail.com

Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online

Masoom shahi T, ehsani J, Ebrahimi M. Isolation and identification of the predominant lactic acid bacteria (LAB) flora from oat bran sourdough and investigation of their antifungal ability. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (5) :408-424

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

The spoilage of bakery products is mainly caused by the growth of molds. *Aspergillus*, which grows in various bakery products, produces aflatoxin leading to serious health problems in people and irreversible economic damage. Food contamination with aflatoxin is a common problem in the tropical and subtropical regions of the world, especially in developing countries (1). Aflatoxin B1 is considered to be the most toxic aflatoxin and the most potent liver carcinogen produced by some species of the genus *Aspergillus*. The successful control of mold growth can be regarded as one of the most critical steps to prevent cancer (2).

During the last two decades, researchers have paid great attention to the use of microorganisms with antagonistic and harmless effects. These microorganisms are known as the major biological methods for food preservation that reduce *Aspergillus* growth and aflatoxins (3). Lactic acid bacteria (LAB) can produce some antimicrobial compounds, including organic acids,

diacetyl, acetone, hydrogen peroxide, antifungal peptides, and bacteriocins, which are effective against a wide range of pathogenic and spoilage-causing fungi **(4)**.

Oats (*Avena sativa* L.), commonly known as Oates, belong to the Gramineae family, which have barley-like fruits with two sharp-edged points. Oat species are kind of weeds that are cultivated in different parts of the world, even in Iran due to their compatibility with different climates **(5, 6)**. The sourdough obtained from this grain can be considered as one of the remarkable sources of LAB.

There are numerous studies on the isolation and identification of LAB from yeast, as well as on the antifungal activity of these isolates. For example, Demirbas *et al*. (2017) isolated 15 LAB from a traditional sourdough sample and examined their antifungal properties. They showed that *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus paralimentarius* had the highest antifungal potential against *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus niger* **(7)**. According to a study conducted by Sadeghi *et al*. (2016), *Pediococcus pentosaceus* isolated from the sourdough of barley flour and the supernatant obtained by cultivating this lactic isolate against *Aspergillus* had antifungal properties **(8)**.

The possibility of finding isolates with unique capabilities has always augmented the application of the new methods of identifying and determining the functional properties of LAB in the less studied ecosystems. Fermented food products, such as fermented bran are ideal habitats for LAB. Consequently, the present study aimed to isolate and identify dominant lactic isolates in the sourdough of oat bran and investigate their antifungal influence on *A. niger*.

Materials and Methods

This experimental study was conducted in 2019 in the Microbiology Laboratory of the Deputy of Food and Drug Administration in Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. First, barley bran flour was purchased from the suppliers of Gorgan city. Following the determination of some of its characteristics, namely moisture content, protein, and ash based on the previously documented procedures **(9)**, sourdough was prepared.

Sourdough Preparation

In order to prepare sourdough from oat bran flour, based on the efficiency of dough [(dough/ flour)×100], respectively, 450 and 160. Supplying of the proper ratio was followed by fermenting the prepared sourdough at 37°C for 24 h. Next, 20% of sourdough was added to the water and flour mixture every single day (i.e., inoculation) and was left in the oven at 37°C for 24 h **(10)**.

Isolation and Primary Identification of Lactic Acid Bacteria

First, 10 g of each sourdough sample was transferred to 90 mL of Ringer's solution under sterile conditions. Afterwards, a serial dilution of the solution was made in eight tubes containing 9 mL of sterile Ringer's solution until reaching the dilution of 10^9. Two replications of pour culture were completed on deMan, Rogosa, and Sharpe (MRS) agar from the obtained dilutions and the plates were incubated in a CO_2 incubator at 37°C for 48 h in the presence of 10% CO_2.

In the next step, several colonies were selected from each plate based on the differences in the morphological characteristics of colonies (e.g., color, shape, being convex or concave, and being superficial or deep) and linear culture was performed for purification and propagation on MRS agar medium. Isolation was followed by the initial detection of lactic isolates using biochemical methods, such as catalase test and gram staining **(10)**.

Identification of Lactic Acid Bacteria by Polymerase Chain Reaction

In addition to the initial isolation and identification of lactic isolates using biochemical and morphological methods, including catalase test and gram staining, LAB identification using polymerase chain reaction (PCR) was conducted with specific primers **(11)**. At this stage, DNA extraction was performed by GeneAll Commercial Kit (South Korea) according to the manufacturer's instructions. The applied primer and PCR reaction conditions were selected according to the method of Young *et al*. (2012).

The initial evaluation of PCR products by electrophoresis was completed on 1.5% agarose gel applying a voltage of 90 V for 40 min. Following electrophoresis and initial approval, PCR products were sent to Bioneer Corporation, South Korea for sequencing. Afterwards, the obtained sequences were compared with the sequences in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using Blast software and the lactic isolates were identified in terms of genius and species **(11)**.

Antifungal Activity of Lactic Isolates

In order to investigate the antifungal activity of lactic isolates, two lines of 3 cm were cultured at a distance of 2 cm from the activated culture on MRS agar medium. Following incubation for 72 h at 37ºC in 10% CO_2, 5 mL of yeast extract glucose chloramphenicol (YGC) medium containing mold spores (10^4 spore/mL) was added to the plate surface, and it was incubated at 37ºC under aerobic conditions. The diameter of the mold colony was measured daily utilizing ImageJ software until the control plate (i.e., MRS agar and a layer of YGC medium containing mold spores) was

completely covered with mold. The lactic isolates that inhibited mold growth were selected (12).

Preparation of Cell-free Supernatants

The lactic isolate suspension with OD_{600}=1 was centrifugation at 10000 rpm and 4ºC for 5 min and the cell-free supernatant was isolated. Afterwards, the antimicrobial effect of organic acids was inhibited and the neutral cell-free supernatant was obtained using 0.1 N NaOH and achieving a pH of 6.5, which was the initial pH of the culture medium (13).

Antifungal Activity of the Supernatants of Lactic Isolates

To determine the antifungal effect of the supernatant, 1%-10% of the cell-free supernatant was added to the sterile YGC medium (45ºC) and it was poured into the plate. The control sample included a YGC medium with 10% sterile distilled water. Following the coagulation of the culture medium, 3 µL of fungal spore containing 10^4 spore/mL was placed as dots on the surface and at the central part of the plate. The plates were placed under aerobic conditions at 26ºC and the mold growth rate was measured daily until the mold in the control sample completely covered the plate surface. Lactic isolate with the lowest minimum inhibitory concentration (MIC) (i.e., the minimum concentration of supernatant that significantly reduced mold growth, compared to the control sample) on the examined molds was selected (14).

Compounds of the Cell-free Supernatant of Lactic Isolates

The supernatant obtained from the lactic isolate with the highest level of antifungal activity was dried by freeze-dryer. Next, 18 g of the obtained powder was dissolved in 100 ml of sterile distilled water. A total of 20 ml of the resultant solution was added to the ethyl acetate solvent in a ratio of 1:3 and was shaken continuously by hand for 15 min. During this procedure, all organic compounds were transferred to the ethyl acetate phase and this phase was placed on the surface of the aqueous phase.

At this stage, the mentioned phase was slowly isolated from the aqueous phase and this process was repeated twice for better extraction of organic compounds. Ethyl acetate was then evaporated using a rotary evaporator at 65ºC under vacuum conditions and the residual containing organic compounds was isolated (14). To identify the organic compounds, the samples were finally sent to the Chemistry and Chemical Engineering Research Institute of Iran under refrigerated conditions. The compounds of the cell-free supernatant of the lactic isolates were identified using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) (Agilent, model 7890B, USA). The carrier gas (mobile phase) of the GC/MS was helium with a flow rate of 1 mL/min and the column (fixed phase) was Agilent Hp5Ms with a length of 30 m, an internal diameter of 0.25 mm, and a thickness of 0.25 µm.

Statistical Analysis

The data were statistically analyzed using SPSS software version 16 and Excel version 2007. All tests were performed with three repetitions in a completely randomized design. The means were compared by the LSD test at a 5% level.

Results

Characteristics of Raw Materials and Changes in pH and Titratable Acidity

The results of the chemical tests of oat bran flour, including the percentage of moisture, protein, and ash are given in Table 1.

Table 1. Chemical characteristics of oat bran flour

Moisture	Ash	Protein
10.24±0.04	2.74±0.01	13.68±0.01

Moreover, the trend of variations in the titratable acidity of sourdough obtained through inoculation during four consecutive days is shown in Table 2. As could be seen, pH decreased with fermentation time and the titratable acidity of the oat bran sourdough augmented. In addition, a comparison of the sourdough titratable acidity values during 72 consecutive hours of inoculation process revealed a significant difference (P<0.05) after 48 h, while there was no significant difference between 48 h and 72 h (P<0.05).

Table 2. pH and titratable acidity changes during the fermentation of oat bran sourdough

Time	pH	Titrable acidity (°D)
0	6.42±0.05[a]	16.45±0.35[a]
24	6.02±0.02[a]	20.96±1.15[b]
48	4.92±0.05[b]	31.45±0.4[c]
72	4.58±0.06[c]	33.35±1.25[c]

Isolation and Identification of Lactic Isolates

In order to identify the predominant lactic isolates after 3 days of repeating the sourdough inoculation process, the LAB of each sourdough were isolated as described. The findings of the initial tests confirmed that the isolates were gram-positive and catalase-negative. Furthermore, according to Figure 1, the gel electrophoresis of PCR products confirmed the amplification of a target sequence of 1500 bp. The comparison of sequenced products with the sequences in World Gene Bank helped to identify the isolates *L. brevis*, *L. sakei* NBRC 15893, and *Enterococcus hirae* ATCC9790 with 99%, 95%, and 97% similarity, respectively. Moreover, *P. pentosaceus* ATCC 20336 isolate was found to have a similarity of 92%.

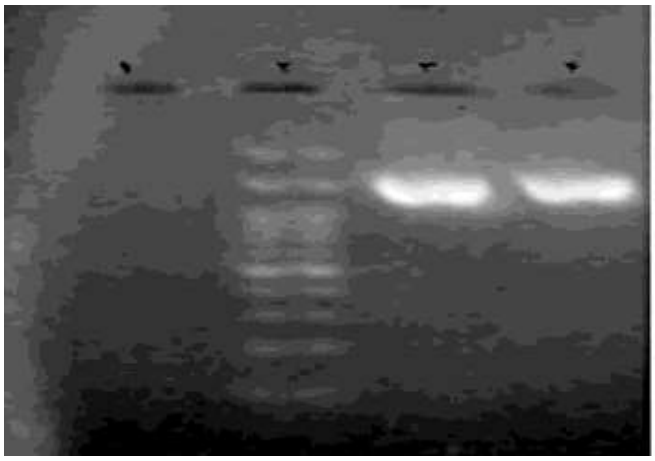

Figure 1. Gel electrophoresis of PCR products and a specific primer with the target sequence of 1500 bp to identify the lactic isolate (line) in the vicinity of the marker of 100 bp (Line 2), positive control samples containing DNA from pure *Lactococcus lactis* culture (PTCC 1336) (Line 3), and negative or bactericidal control (Line 1)

Effect of Lactic Isolates on the Growth of *A. niger*

The antifungal activity of lactic isolates against *A. niger* is demonstrated in Table 3. According to Table 3, *A. niger* covered the whole surface of the control plate at the end of the fourth day, while the growth of the fungi in the presence of lactic isolates varied from 69.75%-100%.

Table 3. Growth percentage of *A. niger* in the presence of lactic isolates during 4 days of incubation

Sample	Day			
	1	2	3	4
Control	10.56 ± 1.42^{Ad}	56.05 ± 5.86^{Ac}	95.32 ± 2.11^{Ab}	100 ± 0.0^{Aa}
L. brevis	0.0 ± 0.0^{Bc}	0.0 ± 0.0^{Cc}	20.25 ± 4.8^{Eb}	69.75 ± 3.07^{Ca}
L. sakei	0.0 ± 0.0^{Bd}	7.1 ± 2.41^{Dc}	37.33 ± 1.59^{Db}	81.53 ± 4.12^{Ba}
E. hirae	0.0 ± 0.0^{Bd}	51.03 ± 5.02^{Ac}	86.48 ± 5.76^{Bb}	100 ± 0.0^{Aa}
P. pentosaceous	0.0 ± 0.0^{Bd}	29.45 ± 2.35^{Bc}	75.44 ± 3.91^{Cb}	100 ± 0.0^{Aa}

* Similar lowercase letters in each row indicate that there is no significant difference between the means ($P<0.05$)
* Similar capital letters in each column indicate that there is no significant difference between the means ($P<0.05$)

According to the results presented in Table 3, at the end of the fourth day, two of the four studied lactic isolates did not impose a significant impact on the reduction of *A. niger* growth, compared to the control plate. However, *L. brevis* and *L. sakei* had the highest inhibitory effects of 30.25% (Figure 2) and 18.47% against *A. niger*, respectively. Therefore, the antifungal influence of their supernatants was investigated.

According to the results of Table 4 and Figure 3, the MIC of the raw supernatants of *L. brevis* and *L. sakei* against *A. niger* was 3% with *L. brevis* having a higher inhibitory potential than *L. sakei* at all three supernatant levels.

Figure 2. Antifungal effect of *L. brevis* (A) against *A. niger* and comparison with the control sample (B)

Table 4. Growth percentage of *A. niger* in the presence of the raw supernatant of lactic isolates

Raw supernatant (%)	*L. brevis*	*L. sakei*
Control (0)	100 ± 0.0^{Aa}	100 ± 0.0^{Aa}
1	100 ± 0.0^{Aa}	100 ± 0.0^{Aa}
2	100 ± 0.0^{Aa}	100 ± 0.0^{Aa}
3	66.33 ± 8.78^{Bb}	97.65 ± 2.05^{Aa}
4	47.93 ± 5.35^{Bc}	94.18 ± 2.16^{Ab}
5	34.14 ± 8.65^{Bc}	89.72 ± 3.55^{Ac}

* Similar lowercase letters in each column indicate that there is no significant difference between the means ($P<0.05$)
* Similar capital letters in each row indicate that there is no significant difference between the means ($P<0.05$)

Figure 3. *A. niger* growth in the presence of 3% *L. brevis* supernatant (B), compared to the control sample (A)

Raw Supernatant Organic Compounds

As described, our findings indicated that *L. brevis* raw supernatant had a more remarkable antifungal effect. Consequently, the compounds of the raw supernatant of this bacterium were studied and identified using GC/MS. The results revealed 14 compounds in raw supernatants, such as fatty acids, esters, phenols, and barbiturates (Table 5).

Table 5. Organic compounds identified in raw supernatant

	Compound	Group	Retention time
1	Lactic acid, 3-phenyl-methyl ester	Ester	13.691
2	n-Decanoic acid	Fatty acid	13.883
3	Benzenepropanoic acid, a-hydroxy-methyl ester	Ester	15.231
4	Acetic acid	Fatty acid	19.754
5	5-Ethyl-5-isopropylpyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione	Barbiturates	20.202
6	Pentadecanoic acid	Fatty acid	20.458
7	Palmitic acid	Fatty acid	20.914
8	1-Mono-linolein	Fatty acid	22.373
9	9-Hexadecenoic acid	Fatty acid	22.652
10	Decanedioic acid dibutyl ester	Ester	24.343
11	Hexanedioic acid mono(2-ethylhexyl) ester	Ester	24.544
12	Octadecanoic acid 9,10-dihydroxy-methyl ester	Ester	24.778
13	N-Formyl-D-phenylalanine	Phenol	25.109
14	5-Ethenyl-5-pentan-2-yl-1,3-diazinane-2,4,6-trione (vinilbital)	Barbiturates	26.882

Discussion

Developed countries have seriously explored and recognized the novel species of LAB for industrial applications and have used these bacteria extensively for about a century. However, Iran has only addressed this subject during recent years. Therefore, considering many unknown ecosystems, especially microbial, fundamental research should be performed as the first step toward creating an acceptable microbial bank from the LAB in the pristine regions of Iran. Following the research examination, these isolates can be used industrially.

This group of bacteria can produce antimicrobial compounds, such as organic acids, diacetyl, acetone, hydrogen peroxide, antifungal peptides, and bacteriocins, which are effective against a wide range of pathogenic and spoilage-causing fungi **(8)**. In the meantime, oat bran is considered as a source of soluble dietary fiber, which has long been used in breakfast cereals or bakery products. In addition, sourdough is regarded as one of the most important sources of LAB. Nowadays, the microbial flora of fermented products and cultivation-based methods is identified and classified using molecular techniques, including PCR **(15)**.

In the current study, four types of LAB, namely *L. Brevis*, *L. sakei*, *E. hirae*, and *P. pentosaceus* were isolated from the sourdough of oat bran and were identified by some primary tests, such as gram staining and catalase test followed by the sequencing of PCR products. Similar to the present study, Gobbetti *et al.* (1998) managed to isolate *L. brevis*, *L. plantarum*, and *L. fermentum* from a sample of wheat flour sourdough as the dominant isolates **(16)**. Holzapfel and Wood (1995) reported *L. brevis* and *L. fermentum* as the dominant bacteria in sourdough **(17)**.

Katina *et al.* (2012) in another investigation encountered a predominantly different microbial population of obligate heterofermentative species, such as *Weissella cibaria* and *W. confuse* during the spontaneous fermentation of wheat bran **(18)**. Simsek *et al.* (2006) evaluated 60 sourdough samples collected from traditional Turkish bakeries. They isolated *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. viridescens*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. sakei*, and various other species of *Lactobacillus* and *Pediococcus*. In a study conducted on the biodiversity of LAB in French sourdough **(19)**, Robert *et al.* (2009) found that 38% of the isolated LAB belonged to *Pediococcus* genus **(20)**.

Concerning the antifungal activity of lactic isolates obtained from the sourdough of barley bran against *A. niger*, we found that *L. brevis* and *L. sakei* isolates had higher inhibitory potential. The inhibitory impact of this bacteria on the growth of the studied fungus can be attributed to the influence of produced metabolites on germination and fungal growth, compared to the control sample **(21)**.

Our results are consistent with the findings of Rejiniemon *et al*. (2015) who showed that lactic acid isolates obtained from malt fermentation products can significantly inhibit the growth of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium* by producing phenyllactic acid and 4-hydroxy phenyllactic acid **(22)**. Diase *et al.* (2014) evaluated the antifungal effect of *L. brevis* as an

inhibitor of *Aspergillus* growth. Their findings suggested that lactic isolates could delay the growth of *Aspergillus* fungi. They attributed this property to the high production of organic acids by this lactic isolate, such as phenyl lactic acid, 4-hydroxyphenyl lactic acid, and other antifungal protein compounds **(23)**.

Manini *et al.* (2016) stated that *L. brevis* isolated from the sourdough of wheat bran had an effective potential to inhibit the growth of *A. niger*. This inhibitory property on the growth of the studied fungi might be due to the effect of its metabolites on the germination and growth of the fungi **(24)**.

Coda *et al*. (2011) evaluated the antifungal activity of LAB, including *L. plantarum 1A7* and *Wickerhamomyces anomalus LCF1695* on the fungi *Penicillium roqueforti DPPMAF1* that can elevate the shelf life of wheat bread. Among these isolates, only *L. plantarum 1A7* could inhibit *Penicillium* fungi and fungal contamination was not observed in the bread produced with sourdough containing this lactic isolate for up to 7 days **(25)**.

Yan *et al*. (2016) conducted research on the antifungal activity of *L. plantarum* against *P. roqueforti* under laboratory conditions as a preservative in the processing of Chinese steamed bread. These authors indicated that *L. plantarum* had an appropriate inhibitory potential on the growth and germination of *Penicillium* spores. According to the results of the mentioned study, acetic acid and phenyllactic acid produced by this lactic acid isolate were the most important antifungal factors of this isolate. Chinese steamed bread prepared using this lactic isolate had a suitable sensory characteristic for up to 7 days and no fungal contamination was observed in it **(26)**.

Conclusion

Fungal spoilage of bakery products could lead to severe economic loss and health damage to any country. The loss of bakery products, on one hand, and the risks posed by the production of mycotoxins to human health, on the other hand, have prompted researchers to conduct some studies on the use of microorganisms or their metabolites for preventing fungal spoilage and improving food shelf life.

According to the results of the present study, among the four studied lactic isolates, *L. brevis* and *L. sakei* had the highest inhibitory effects of 30.25% and 18.47% against *A. niger*, respectively. Consequently, the antifungal effect of the supernatant of these species was examined. The MIC of a supernatant deterrent for *L. brevis* and *L. sakei* against *A. niger* was 3%.

Considering the greater effect of the supernatant of *L. brevis*, the compounds of its supernatant were identified using GC/MS. We observed that it consisted of 15 compounds, including ester, phenol, and barbiturates. Therefore, it can be concluded that the predominant lactic isolates of oat bran sourdough have proper antifungal influence against *A. niger* making it suitable as a starter culture or mobile culture in the production of fermented products, such as sourdough to reduce fungal spoilage.

Acknowledgment

The authors would like to thank the esteemed experts of the Food Control Laboratory of Golestan University of Medical Sciences for their sincere cooperation in conducting this research, as well as the professors and officials of Saee Higher Education Institute of Gorgan for their assistance.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۴ ـ شماره ۵ ـ مهر و آبان ۱۳۹۹

Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی و شناسایی فلور باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) غالب از خمیر ترش سبوس جو دوسر و بررسی قابلیت ضد قارچی آنها

طاهره معصوم شاهی[۱]، جلال احسانی[۱*]، مریم ابراهیمی[۱]

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

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۱۴

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۶

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۷/۰۶

موضوع: میکروبیولوژی مواد غذایی

نویسندهٔ مسئول:

جلال احسانی، مرکز تحقیقات سلامت فرآورده‌های غذایی، دارویی و طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

ایمیل: Jalal.Ehsani@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: گسترش فزایندهٔ مصرف محصولات تخمیری صنعتی به جای فرآورده‌های سنّتی منجر به از دست رفتن بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک خصوصاً نژادهای تولیدکنندهٔ ترکیبات زیست فعال می‌گردد. هدف از مطالعهٔ حاضر جداسازی، شناسایی مولکولی و بررسی قابلیت ضد قارچی جدایه‌های لاکتیکی بر رشد *Aspergillus niger* بود.

مواد و روش کار: پس از خرید سبوس جو دوسر از بازار شهرستان گرگان در سال ۱۳۹۸، تهیهٔ خمیر ترش، جداسازی و شناسایی باکتری‌های غالب در آزمایشگاه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان انجام شد. سپس فعالیت ضد قارچی جدایه‌های لاکتیکی و روماند آنها بر ضد *A. niger* بررسی گردید. در نهایت شناسایی ترکیبات روماند فاقد سلول جدایهٔ لاکتیکی با کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی/ طیف سنج جرمی انجام شد.

یافته‌ها: *Lactobacillus brevis* و *Lactobacillus sakei* به ترتیب با ۳۰/۲۵ و ۱۸/۴۷ درصد دارای بیشترین میزان بازدارندگی علیه *A. niger* بودند. همچنین حداقل غلظت بازدارندگی روماند *L. brevis* و *L. sakei* بر ضد *A. niger* ۳ درصد بود، که مشخص شد تاثیر بیشتر روماند *L. brevis* به‌واسطهٔ حضور ترکیبات استری، فنلی و باربیتورات بود.

نتیجه‌گیری: جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیر ترش‌های سبوس جو دوسر و همچنین پالیدهٔ کشت آنها از قابلیت ضد قارچی مناسبی علیه *A. niger* برخوردار بودند، پس می‌توانند به‌عنوان کشت آغازگر یا کشت همراه در فرآوری محصولات تخمیری نظیر خمیر ترش با هدف کاهش فساد قارچی استفاده شوند.

کلید واژه‌ها: اثر ضد قارچی، باکتری‌های اسید لاکتیک، خمیر ترش.

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

فساد محصولات نانوایی اساساً ناشی از رشد کپک‌هاست. رشد کپک‌ها به خصوص کپک *Aspergillus* در فرآورده‌های مختلف نانوایی، علاوه بر خسارت اقتصادی جبران‌ناپذیر، سبب تولید آفلاتوکسین شده و مشکلات عدیده‌ای را برای سلامت افراد جامعه در پی دارد. آلودگی مواد غذایی با آفلاتوکسین یک مشکل رایج در مناطق گرمسیری و نیمه قاره‌ای دنیا به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه است (۱). آفلاتوکسین *B1* سمی‌ترین نوع افلاتوکسین و قوی‌ترین ماده سرطان‌زای کبدی است که توسط برخی از گونه‌های جنس *Aspergillus* تولید می‌گردد. کنترل موفق این کپک می‌تواند گامی مهم در پیشگیری از سرطان باشد (۲). استفاده از میکروارگانیسم‌ها با اثر آنتاگونیسمی و بی‌ضرر برای کاهش رشد کپک *Aspergillus* و متعاقباً کاهش آفلاتوکسین از مهم‌ترین روش‌های نگهداری زیستی مواد غذایی محسوب می‌شود (۳) که در دو دهه اخیر بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. در این بین باکتری‌های اسید لاکتیک از قابلیت تولید ترکیبات ضد میکروبی نظیر اسیدهای آلی، دی استیل، استون، پراکسید هیدروژن، پپتیدهای ضد قارچی و باکتریوسین‌ها برخوردارند که در مقابل طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زا و مولد فساد موثر هستند (۴). جو دو سر یا یولاف (*Avena sativ* L.) با نام عمومی Oates از خانواده گندمیان (*Gramineae*) بوده که دارای میوه‌هایی شبیه به جو و منتهی به دو نوک تیز است. جو دو سر از

علف‌های خودرو بوده و به علت سازگاری با انواع آب و هوا در نقاط مختلفی از دنیا و حتی ایران کشت می‌گردد (۶، ۵). خمیر ترش این دانه غله‌ای می‌تواند به‌عنوان یکی از منابع مهم جهت جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک مطرح باشد. در ارتباط با جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک از خمیر ترش و همچنین در ارتباط با بررسی ضد قارچی این جدایه‌ها پژوهش‌های متعددی به انجام رسیده است. به‌طور نمونه، Demirbas و همکاران (۲۰۱۷) از یک نمونه خمیرترش سنتی، ۱۵ باکتری اسید لاکتیک را جداسازی و سپس ویژگی‌های ضد قارچی آنها را بررسی کردند. آنها نشان دادند که *Lactobacillus paraplantarum* و *Lactobacillus paralimentarius* بالاترین قابلیت ضد قارچی علیه *Penicillium chrysogenum* و *Aspergillus niger* را داشتند (۷). مطالعات Sadeghi و همکاران (۲۰۱۶) در ارتباط با خاصیت ضد قارچی *Pediococcus pentosaceus* جدا شده از خمیرترش آرد جو و روماندهای حاصل از کشت این جدایه لاکتیکی بر علیه *Aspergillus* نشان داد که جدایه لاکتیکی *P. pentosaceus* و همچنین روماندهای حاصل از کشت آن دارای خاصیت ضد قارچی بودند (۸).

همواره استفاده از روش‌های نوین شناسایی و تعیین ویژگی‌های کاربردی باکتری‌های اسید لاکتیک در زیست‌بوم‌هایی که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند امکان دستیابی به جدایه‌هایی با قابلیت‌های منحصر به فرد را افزایش داده است. فرآورده‌های غذایی تخمیری نظیر سبوس‌های تخمیر شده، زیستگاه بسیار مناسبی برای باکتری‌های اسید لاکتیک محسوب می‌شوند. بر این اساس هدف از این پژوهش، جداسازی، شناسایی مولکولی و بررسی تاثیر جدایه‌های لاکتیکی غالب موجود در خمیرترش سبوس جو دو سر و قابلیت ضد قارچی آنها بر رشد *A. niger* است.

روش پژوهش

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه میکروب‌شناسی، معاونت غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی گلستان انجام شد. در این پژوهش پس از تهیهٔ آرد سبوس جو دو سر از سطح عرضه شهرستان گرگان، برخی از ویژگی‌های آن نظیر درصد رطوبت، پروتئین و خاکستر براساس روش‌های مدون تعیین گردید (۹) و در مرحله بعد خمیر ترش آن تهیه شد.

تهیه خمیرترش

برای تهیهٔ خمیرترش از آرد سبوس جو دوسر، براساس میزان راندمان خمیر (نسبت خمیر به آرد × ۱۰۰) به ترتیب معادل ۴۵۰ و ۱۶۰ پس از تهیه نسبت مناسب، خمیرترش تولیدی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و به مدت ۲۴ ساعت تخمیر شد. سپس در هر روز، ۲۰ درصد از خمیرترش روز قبل به مخلوط آب و آرد، اضافه شد (مایه‌گیری) و دوباره در گرمخانه با دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت (۱۰).

جداسازی و شناسایی اولیه باکتری‌های اسید لاکتیک

۱۰ گرم از هر نمونه خمیرترش تحت شرایط استریل به ۹۰ میلی‌لیتر محلول رینگر انتقال یافت. سپس در ۸ لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر محلول رینگر استریل تا رقت 10^{-9} رقت‌سازی سریالی انجام گرفت. از رقت‌های به دست آمده، بر روی MRS agar کشت مخلوط داده شد (دو تکرار) و سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت در حضور ۱۰ درصد دی اکسید کربن گرمخانه‌گذاری (انکوباتور CO_2 دار) شد. در مرحله بعدی، از هر پلیت براساس تفاوت در ویژگی‌های مورفولوژیکی پرگنه‌ها (رنگ، شکل، تحدب و تعقر، عمقی یا سطحی بودن) چند پرگنه انتخاب و برای خالص‌سازی و تکثیر بر روی محیط کشت MRS agar، کشت خطی داده شد. پس از جداسازی، شناسایی اولیه جدایه‌های لاکتیکی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی نظیر آزمون کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم انجام گرفت (۱۰).

شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction)

پس از جداسازی و شناسایی اولیه جدایه‌های لاکتیکی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی شامل آزمون‌های کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم، شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از PCR دارای پرایمر اختصاصی انجام گرفت (۱۱). در این مرحله، استخراج DNA توسط کیت تجاری GeneAll (کره جنوبی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. همچنین پرایمر مورد استفاده و شرایط واکنش PCR مطابق روش Yang و همکاران (۲۰۱۲) انتخاب گردید. بررسی اولیه محصولات PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۹۰ ولت و زمان ۴۰ دقیقه انجام شد. پس از الکتروفورز و تایید اولیه، محصولات PCR جهت توالی‌یابی به شرکت بیونیر کره جنوبی ارسال گردید. سپس به‌منظور شناسایی جدایه‌های لاکتیکی توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی (National Center Bitechnology Information) NCBI به کمک نرم‌افزار Blast مقایسه و جدایه لاکتیکی در حد جنس و گونه شناسایی شد (۱۱).

بررسی فعالیت ضد قارچی جدایه‌های لاکتیکی

برای بررسی فعالیت ضد قارچی جدایه‌های لاکتیکی، از کشت فعال شده آنها، ۲ خط ۳ سانتی‌متری با فاصله ۲ سانتی‌متر از هم بر روی محیط کشت MRS agar کشیده شد. پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای۳۷ درجه سلسیوس و حضور ۱۰٪ دی‌اکسید کربن، ۵ میلی‌لیتر محیط کشت YGC حاوی اسپور کپک ($۱۰^۴$ اسپور در هر میلی‌لیتر) به سطح پلیت اضافه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری شد. سپس قطر رشد کلنی کپک به صورت روزانه تا زمانی که کپک در نمونه کنترل (پلیت حاوی محیط کشت MRS agar با لایه‌ای از محیط کشت YGC حاوی اسپور کپک) به‌طور کامل سطح پلیت را بپوشاند با کمک نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری گردید و جدایه‌های لاکتیکی که قطر هاله عدم رشد بزرگتری بر روی کپک‌های مورد بررسی ایجاد کردند، انتخاب شد (۱۲).

تهیه روماند فاقد سلول

سوسپانسیون جدایه لاکتیکی فعال شده با $OD_{۶۰۰}$=۱، سانتریفوژ (۱۰۰۰۰ rpm، دمای ۴ درجهٔ سلسیوس و ۵ دقیقه) و در نتیجه روماند فاقد سلول جدا گردید. در ادامه با اضافه کردن سود ۰/۱ نرمال و رساندن pH تا ۶/۵ (pH اولیه محیط کشت)، اثر ضد میکروبی اسیدهای آلی حذف و روماند فاقد سلول خنثی به‌دست آمد (۱۳).

بررسی فعالیت ضد قارچی روماند جدایه‌های لاکتیکی

برای تعیین اثر ضد کپکی، ۱ تا ۱۰ درصد از روماند فاقد سلول به محیط کشت YGC استریل (۴۵ درجه سلسیوس)، اضافه و در پلیت ریخته شد. نمونه کنترل، شامل محیط کشت YGC حاوی ۱۰ درصد آب مقطر استریل است. پس از انعقاد محیط کشت، ۳ میکرولیتر از اسپور قارچ (حاوی $۱۰^۴$ اسپور در هر میلی‌لیتر) به صورت نقطه‌ای روی سطح و در قسمت مرکزی پلیت قرار داده شد. سپس پلیت‌ها در شرایط هوازی در دمای۲۶ درجه سلسیوس قرار گرفتند و به صورت روزانه، میزان رشد کپک تا زمانی که کپک در نمونه کنترل به‌طور کامل سطح پلیت را بپوشاند اندازه‌گیری گردید. جدایه لاکتیکی که دارای پایین‌ترین حداقل غلظت بازدارندگی (حداقل غلظتی از روماند که به شکل معنی‌داری در مقایسه با نمونه کنترل، میزان رشد کپک را کاهش دهد) بر روی کپک‌های مورد بررسی باشد برای ادامه مطالعه انتخاب شد (۱۴).

شناسایی ترکیبات روماند فاقد سلول جدایه لاکتیکی با کمک کروماتوگرافی گازی طیف‌سنج جرمی

ابتدا روماند به‌دست‌آمده از جدایه لاکتیکی (با بیشترین فعالیت ضد قارچی) با استفاده از خشک‌کن انجمادی، خشک شد. سپس ۱۸ گرم از پودر به‌دست‌آمده در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد و ۲۰ میلی‌لیتر از محلول به‌دست‌آمده با نسبت ۱ به ۳ به حلال اتیل استات اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه به‌صورت مداوم و با دست تکان داده شد. طی این عمل کلیه ترکیبات آلی به فاز اتیل استات منتقل گردید و این فاز در سطح فاز آبی قرار گرفت. در این مرحله فاز مذکور به آرامی از فاز آبی جدا گردید و برای استحصال بهتر ترکیبات آلی، این عمل دو بار دیگر تکرار شد. سپس اتیل استات به کمک دستگاه روتاری (دمای ۶۵ درجه سلسیوس، تحت شرایط خلاء)، تبخیر و باقی‌مانده حاوی ترکیبات آلی جدا شد (۱۴). در نهایت نمونه‌ها در شرایط یخچالی به پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران برای شناسایی ترکیبات آلی، ارسال گردید. مشخصات دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنج جرمی مورد استفاده در این تحقیق عبارت است از:

- شرکت و کشور سازنده: Agilent، مدل 7890B، آمریکا
- گاز حامل (فاز متحرک): گاز هلیوم با جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه
- ستون (فاز ثابت): Agilent Hp5Ms با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر

آنالیز آماری

تمام آزمون‌ها با سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. مقایسه میانگین‌ها با کمک آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام شد. برای آنالیز آماری و ترسیم نمودارها از SPSS نسخهٔ ۱۶ (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) و Excel نسخه ۲۰۰۷ استفاده گردید.

یافته‌ها

ویژگی‌های مواد خام و تغییرات pH و اسیدیته قابل تیتر در طول دوره تخمیر خمیرترش سبوس جو دوسر

نتایج حاصل از آزمون‌های شیمیایی آرد سبوس جو دوسر شامل درصد رطوبت، پروتئین و خاکستر در جدول ۱ آورده شده است.

همچنین روند تغییرات اسیدیتهٔ قابل تیتر خمیرترش تولیدی طی ۴ روز متوالی فرایند مایه‌گیری در جدول ۲ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌گردد با افزایش زمان

تخمیر، میزان pH کاهش و میزان اسیدیتهٔ قابل تیتر خمیرترش سبوس جو دوسر افزایش یافته است. همچنین مقایسهٔ مقادیر اسیدیتهٔ قابل تیتر خمیرترش طی ۷۲ ساعت متوالی تکرار فرایند مایه‌گیری نیز حاکی از اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) طی ۴۸ ساعت بود ولی بین ۴۸ ساعت با ۷۲ ساعت، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P<۰/۰۵$).

جدول ۱. ویژگی‌های شیمیایی آرد سبوس جو دوسر

رطوبت	خاکستر	پروتئین
۱۰/۲۴ ۰±/۰۴	۲/۷۴ ± ۰/۰۱	۱۳/۶۸ ± ۰/۰۱

جدول ۲. تغییرات pH و اسیدیته قابل تیتر در طول تخمیر خمیرترش سبوس جودوسر

زمان	pH	اسیدیته قابل تیتر (دورنیک)
۰	[a]۰/۰۵±۶/۴۲	[a]۰/۳۵±۱۶/۴۵
۲۴	[a]۰/۰۲±۶/۰۲	[b]۱/۱۵±۲۰/۹۶
۴۸	[b]۰/۰۵±۴/۹۴	[c]۰/۴±۳۱/۴۵
۷۲	[c]۰/۰۶±۴/۵۸	[c]۱/۲۵±۳۳/۳۵

جداسازی و شناسایی جدایه‌های لاکتیکی

به‌منظور شناسایی جدایه‌های لاکتیکی غالب پس از ۳ روز تکرار فرایند مایه‌گیری خمیرترش، باکتری‌های اسید لاکتیک هر خمیر ترش به روشی که توضیح داده شد جدا گردیدند. نتایج آزمون‌های اولیه نیز گرم مثبت و کاتالاز منفی بودن جدایه‌ها را تایید نمود. همچنین با توجه به شکل ۱، ژل الکتروفورز محصولات PCR نیز موید تکثیر توالی هدف ۱۵۰۰ جفت بازی است. نتایج توالی‌یابی محصولات PCR پس از مقایسه هم‌ردیفی با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن منجر به شناسایی جدایه *L. brevis* ATCC14889 با درصد تشابه ۹۹، جدایه *Lactobacillus sakei* NBRC 15893 با درصد تشابه ۹۵، جدایه *Enterococcus hirae* ATCC9790 با درصد تشابه ۹۷ و جدایه *P. pentosaceus* ATCC 20336 با درصد تشابه ۹۲ به ترتیب به‌عنوان جدایه های لاکتیکی خمیرترش سبوس جو دو سر شد.

شکل ۱. ژل الکتروفورز محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی با توالی هدف ۱۵۰۰ جفت بازی جهت شناسایی جدایه لاکتیکی (لاین) در مجاورت مارکر صد جفت بازی (لاین ۲) و همچنین نمونه‌های کنترل مثبت حاوی DNA حاصل از کشت خالص *Lactococcus lactis* (PTCC 1336) (لاین ۳) و کنترل منفی یا فاقد باکتری (لاین ۱).

ارزیابی تاثیر جدایه‌های لاکتیکی بر رشد *A. niger*

فعالیت ضد قارچی جدایه‌های لاکتیکی بر ضد *A. niger* در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود *A. niger*، در پایان روز چهارم، تمام سطح پلیت کنترل را پوشانده است، درحالی‌که میزان رشد قارچ در حضور جدایه‌های لاکتیکی از ۱۰۰-۶۹/۷۵ درصد متغیر بود.

جدول ۳. درصد رشد *A. niger* در حضور جدایه‌های لاکتیکی در طول ۴ روز گرمخانه‌گذاری

کد	روز			
	۱	۲	۳	۴
Control	۱۰/۵۶±۱/۴۲^{Ad}	۵۶/۰۵±۵/۸۶^{Ac}	۹۵/۳۲±۲/۱۱^{Ab}	۱۰۰±۰^{Aa}
L. brevis	^{Bc}۰±۰	^{Cc}۰±۰/۰	^{Eb}۴/۸±۲۰/۲۵	^{Ca}۳/۰۷±۶۹/۷۵
L. sakei	^{Bd}۰±۰	^{Dc}۲/۴۱±۷/۱	^{Db}۱/۵۹±۳۷/۳۳	^{Ba}۴/۱۲±۸۱/۵۳
E. hirae	^{Bd}۰±۰	^{Ac}۵/۰۲±۵۱/۰۳	^{Bb}۵/۷۶±۸۶/۴۸	^{Aa}۰±۱۰۰
P.pentosaceous	^{Bd}۰±۰	^{Bc}۲/۳۵±۲۹/۴۵	^{Cb}۳/۹۱±۷۵/۴۴	^{Aa}۰±۱۰۰

* حروف کوچک مشابه در هر ردیف، نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($P<$ ۰/۰۵).

* حروف بزرگ مشابه در هر ستون، نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($P<$ ۰/۰۵).

نتایج نمایش داده شده در جدول ۳، مبین این موضوع است که در پایان روز چهارم از بین ۴ جدایه لاکتیکی مورد بررسی، ۲ جدایه تاثیر معنی‌داری در کاهش رشد *A. niger* در مقایسه با پلیت کنترل نداشت ولی *L. brevis* و *L. sakei* به ترتیب با ۳۰/۲۵ (شکل۲) و ۱۸/۴۷ درصد دارای بیشترین میزان بازدارندگی علیه *A. niger* بودند و به همین علت، اثر ضد قارچی روماند آنها مورد مطالعه قرار گرفت.

شکل ۲. تاثیر ضد قارچی *L. brevis* (شکل A) بر علیه *A. niger* و مقایسه آن با نمونه کنترل (شکل B)

طبق نتایج حاصل از جدول شماره ۴ و شکل شماره ۳ حداقل غلظت بازدارندگی روماند خام *L. brevis* و *L. sakei* علیه *A. niger* ۳ درصد بود، در این بین قدرت بازدارندگی *L. brevis* نسبت به *L. sakei* در هر سه سطح روماند بیشتر بود.

جدول ۴. درصد رشد *A. niger* در حضور روماند خام جدایه‌های لاکتیکی

روماند خام (درصد)	*L. brevis*	*L. sakei*
۰ (کنترل)	۱۰۰±۰^{Aa}	۱۰۰±۰^{Aa}
۱	۱۰۰±۰^{Aa}	۱۰۰±۰^{Aa}
۲	۱۰۰±۰^{Aa}	۱۰۰±۰^{Aa}
۳	۶۶/۳۳±۸/۷۸^{Bb}	۹۷/۶۵±۲/۰۵^{Aa}
۴	۴۷/۹۳±۵/۳۵^{Bc}	۹۴/۱۸±۲/۱۶^{Ab}
۵	۳۴/۱۴±۸/۶۵^{Bc}	۸۹/۷۲±۳/۵۵^{Ac}

* حروف کوچک مشابه در هر ستون، نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است (P<۰/۰۵).

* حروف بزرگ مشابه در هر ردیف نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است (P<۰/۰۵).

شکل ۳. رشد *A. niger* در حضور ۳ درصد از روماند *L. brevis* (شکل B) در مقایسه با نمونه کنترل (شکل A)

جداسازی و ارزیابی ترکیبات آلی روماند خام

با توجه به نتایج قسمت قبل و تاثیر بیشتر روماند خام *L. brevis*، ترکیبات روماند خام این باکتری با کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی مورد مطالعه و شناسایی قرار گرفت. با استفاده از شباهت طیف جرمی و کتابخانه جرمی دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی، به ترتیب ۱۴ ترکیب در روماند خام که شامل اسیدهای چرب، استر، فنل، باربیتورات‌ها بود شناسایی گردید (جدول ۵).

جدول ۵. ترکیبات آلی شناسایی شده در روماند خام

ردیف	نام ترکیب	گروه	زمان بازداری
۱	*Lactic acid, 3-phenyl-methyl ester*	استر	۱۳/۶۹۱
۲	*n-Decanoic acid*	اسید چرب	۱۳/۸۸۳
۳	*Benzenepropanoic acid, a-hydroxy-methyl ester*	استر	۱۵/۲۳۱
۴	*Acetic acid*	اسید چرب	۱۹/۷۵۴

ردیف	نام ترکیب	گروه	زمان بازداری
۵	*5-Ethyl-5-isopropylpyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione*	باربیتورات	۲۰/۲۰۲
۶	*Pentadecanoic acid*	اسید چرب	۲۰/۴۵۸
۷	*Palmitic acid*	اسید چرب	۲۰/۹۱۴
۸	*1-Mono-linolein*	اسید چرب	۲۲/۳۷۳
۹	*9-Hexadecenoic acid*	اسید چرب	۲۲/۶۵۲
۱۰	*Decanedioic acid dibutyl ester*	استر	۲۴/۳۴۳
۱۱	*Hexanedioic acid mono(2-ethylhexyl) ester*	استر	۲۴/۵۴۴
۱۲	*Octadecanoic acid 9,10-dihydroxy-methyl ester*	استر	۲۴/۷۸۸
۱۳	*N-Formyl-D-phenylalanine*	فنل	۲۵/۱۰۹
۱۴	*5-Ethenyl-5-pentan-2-yl-1,3-diazinane-2,4,6-trione (vinilbital)*	باربیتورات	۲۶/۸۸۲

بحث

در حالی که کشورهای پیشرفته حدود یک قرن است که به‌طور جدی به کشف و شناسایی گونه‌های جدید باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) جهت استفاده صنعتی پرداخته‌اند و توانسته‌اند از این باکتری‌ها به‌طور وسیعی در صنعت بهره ببرند، در کشور ما تنها چند سالی است که این مسئله مورد توجه قرار گرفته، که با توجه به ناشناخته بودن بسیاری از زیست بوم‌ها، خصوصاً از نظر میکروبیولوژیکی، نیازمند انجام تحقیقات اصولی است تا بتوان در اولین گام بانک‌های میکروبی قابل قبولی از باکتری‌های اسید لاکتیک مناطق بکر ایران ایجاد کرده و در مراحل بعد با بررسی ویژگی‌های یافته‌ها، شروع به استفاده صنعتی از آنها حرکت کرد. این گروه از باکتری‌ها از قابلیت تولید ترکیبات ضد میکروبی نظیر اسیدهای آلی، دی استیل، استون، پراکسید هیدروژن، پپتیدهای ضد قارچی و باکتریوسین‌ها برخوردارند که در مقابل طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زا و مولد فساد موثر هستند (۸). در این بین سبوس جودوسر یکی از منابع فیبر رژیمی محلول است که از مدت ها پیش در غلات صبحانه یا محصولات نانوایی مورد استفاده قرار گرفته است و خمیر ترش حاصل از آن به‌عنوان یکی از منابع مهم جهت جداسازی باکتری های اسید لاکتیک مطرح است. امروزه فلور میکروبی محصولات تخمیری در کنار روش‌های مبتنی بر کشت، با استفاده از روش‌های مولکولی (PCR) شناسایی و طبقه‌بندی می‌شوند (۱۵).

در این تحقیق چهار نوع باکتری اسید لاکتیک به نام های *L. brevis*، *L. sakei*، *E. hirae*، *P. pentosaceus* از خمیر ترش سبوس جودوسر با انجام آزمون‌های اولیه (رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز) و نتایج حاصل از توالی‌یابی محصولات PCR جداسازی و شناسایی گردید. مشابه تحقیق حاضر، Gobbetti و همکاران (۱۹۹۸) توانستند *L. brevis* و *L. plantarum* و *Lactobacillus fermentum* را از یک نمونه خمیر ترش آرد گندم به‌عنوان جدایه‌های غالب جدا کنند (۱۶). Holzapfel و Wood (۱۹۹۵) نیز گزارش کردند که *L. brevis* و *L. fermentum* باکتری‌های غالب در خمیرترش هستند (۱۷).

همچنین در پژوهشی دیگر، Katina و همکاران (۲۰۱۲) طی تخمیر خود به خودی سبوس گندم با جمعیت میکروبی غالب متفاوتی از گونه های هتروفرمنتاتیو اجباری همچون *Weissella cibaria* و *Weissella confuse* مواجه شدند (۱۸). Simsek و همکاران (۲۰۰۶) نیز از ۶۰ نمونه خمیرترش جمع‌آوری‌شده از نانوایی‌های سنتی ترکیه، *Lactobacillus acidophilus*، *L. plantarum*، *Lactobacillus viridescens*، *L. brevis*، *Lactobacillus delbrueckii*، *L. sakei* و گونه‌های مختلف *Lactobacillus* و *Pediococcus* را جداسازی کردند (۱۹). Robert و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی تنوع زیستی باکتری‌های اسید لاکتیک خمیرترش‌های فرانسوی دریافتند که ۳۸ درصد از باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده به جنس *Pediococcus* تعلق داشتند (۲۰).

در ارتباط با فعالیت ضد قارچی جدایه لاکتیکی به‌دست‌آمده از خمیرترش سبوس جو دوسر، پس از بررسی اثر ضد قارچی جدایه لاکتیکی بر *A. niger*، مشخص شد که جدایه‌های *L. brevis* و *L. sakei* قابلیت مهارکنندگی بیشتری دارند. خاصیت بازدارندگی این باکتری بر رشد قارچ مورد مطالعه را می‌توان به توان به تاثیر متابولیت های تولیدی آن بر روی جوانه‌زنی و رشد قارچ در مقایسه با نمونه کنترل نسبت داد (۲۱). این نتایج با آنچه که از بررسی‌های محققین دیگر به‌دست آمده مطابقت دارد. Rejiniemon و همکاران (۲۰۱۵) طی پژوهشی نشان دادند که جدایه‌های لاکتیکی به‌دست‌آمده از محصول تخمیری مالت می‌توانند با تولید اسید فنیل لاکتیک و اسید ۴-هیدروکسی فنیل لاکتیک به طور قابل ملاحظه‌ای رشد *Aspergillus*، *Penicillium* و *Fusarium* را مهار کنند (۲۲). Diase و همکاران (۲۰۱۴) اثر ضد قارچی *L. brevis* را به‌عنوان یک عامل ممانعت‌کننده از رشد قارچ *Aspergillus* مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که جدایه لاکتیکی مذکور می‌تواند رشد قارچ *Aspergillus* را تاخیر بیندازد که این خاصیت را به تولید بالای اسیدهای آلی از جمله اسید فنیل لاکتیک و اسید ۴-هیدروکسی فنیل لاکتیک و سایر ترکیبات پروتئینی ضد قارچی توسط این جدایه لاکتیکی نسبت دادند (۲۳). Manini و همکاران (۲۰۱۶) نیز، بیان کردند *L. brevis* جدا شده از خمیر ترش سبوس گندم، به نحو موثری دارای قابلیت مهارکنندگی رشد *A. niger* بود. خاصیت بازدارندگی این باکتری بر رشد قارچ‌های مورد مطالعه را می‌توان به تاثیر متابولیت‌های تولیدی آن بر روی جوانه‌زنی در رشد قارچ در مقایسه با نمونه کنترل نسبت داد (۲۴).

Coda و همکاران (۲۰۱۱) به روش چاهک فعالیت ضد قارچی باکتری‌های اسید لاکتیک شامل *L. plantarum* 1A7 و *Wickerhamomyces anomalus* LCF1695 را بر روی قارچ *Penicillium roqueforti* برای افزایش زمان ماندگاری نان گندم مورد ارزیابی قرار دادند. از بین جدایه‌های مذکور تنها *L. plantarum* 1A7 قادر به مهار قارچ *Penicillium* بود؛ در نان تولید شده با خمیرترش حاوی این جدایه لاکتیکی تا ۷ روز آلودگی قارچی مشاهده نشد (۲۵).

نتایج تحقیقات Yan و همکاران (۲۰۱۶) بر روی فعالیت ضد قارچی *L. plantarum* علیه *P. roqueforti* در شرایط آزمایشگاهی به‌عنوان یک نگهدارنده در فرآوری نان بخارپز چینی نشان داد که *L. plantarum* از قابلیت مهارکنندگی خوبی روی رشد و جوانه‌زنی اسپور قارچ *Penicillium* برخوردار است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق، اسید استیک و اسید فنیل لاکتیک تولید شده توسط جدایه لاکتیکی مذکور مهمترین عوامل موثر بر فعالیت ضد قارچی این جدایه لاکتیکی بودند. نان بخارپز چینی تهیه شده از این جدایه لاکتیکی تا ۷ روز از ویژگی حسی مطلوبی برخوردار بوده و هیچ‌گونه آلودگی قارچی در آن مشاهده نشد (۲۶).

نتیجه‌گیری

فساد قارچی محصولات نانوایی منجر به ایجاد خسارات سنگین اقتصادی و بهداشتی بر هر کشوری خواهد شد. اتلاف محصولات نانوایی از یک سو و مخاطرات ناشی از تولید مایکوتوکسین‌ها بر سلامت انسان از سوی دیگر باعث شده که تحقیقاتی در زمینه به کارگیری از میکروارگانیسم‌ها و یا متابولیت‌های آنها با هدف جلوگیری از فساد قارچی و افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی برای بهره‌مندی از خصوصیت بازدارندگی زیستی آنها صورت گیرد. براساس نتایج حاصل از این تحقیق از بین چهار جدایه لاکتیکی مورد بررسی، *L. brevis* و *L. sakei* به ترتیب با ۳۰/۲۵ و ۱۸/۴۷ درصد دارای بیشترین میزان بازدارندگی علیه *A. niger* بودند، به همین علت اثر ضد قارچی روماند آنها مورد مطالعه قرارگرفت. حداقل غلظت بازدارندگی روماند *L. brevis* و *L. sakei* علیه *A. niger* به میزان ۳ درصد بود که با توجه به تاثیر بیشتر روماند *L. brevis*، ترکیبات روماند این باکتری با کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی شناسایی شد که شامل ۱۵ ترکیب استری، فنلی و باربیتورات بود. بر این اساس می‌توان گفت که جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیر ترش‌های سبوس جو دوسر و همچنین پالیده کشت آنها از قابلیت ضد قارچی مناسبی علیه *A. niger* برخوردار هستند که می‌توان از آنها به‌عنوان کشت آغازگر یا کشت همراه در فرآوری محصولات تخمیری نظیر خمیر ترش با هدف کاهش فسادهای قارچی استفاده نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان از کارشناسان محترم آزمایشگاه کنترل مواد غذایی معاونت غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی گلستان به‌دلیل همکاری صمیمانه در انجام این تحقیق و همچنین از اساتید و مسئولین موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی ساعی گرگان به‌واسطهٔ مساعدت هایشان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعهٔ حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی نداشته‌اند.

Referance

1. Gupta RC. Chapter 55 - Aflatoxins, ochratoxins and citrinin. In: Gupta RC, editor. Reproductive and Developmental Toxicology. San Diego: Academic Press; 2011. p. 753-63. [DOI:10.1016/B978-0-12-382032-7.10055-4]
2. Wild CP, Montesano R. A model of interaction: aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. Cancer Lett. 2009;286(1):22-8. [DOI:10.1016/j.canlet.2009.02.053] [PMID]
3. Silva JFM da, Peluzio JM, Prado G, Madeira JEGC, Silva MO, de Morais PB, et al. Use of probiotics to control aflatoxin production in peanut grains. Sci World J. 2015;2015:1-8. [DOI:10.1155/2015/959138] [PMID] [PMCID]
4. Gálvez A, Abriouel H, López RL, Omar N Ben. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. Int J Food Microbiol. 2007;120(1-2):51-70. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001] [PMID]
5. Zargari A. Medicinal Plants. 7th ed. Tehran university; 2011. 870 p.
6. Salehi sormaghi MH. Medicinal Plants and Phytotherapy. 3rd ed. Donyaye Taghzieh; 2010. 440 p.
7. Demirbaş F, İspirli H, Kurnaz AA, Yilmaz MT, Dertli E. Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. LWT-Food Sci Technol. 2017;79:361-6. [DOI:10.1016/j.lwt.2017.01.067]
8. Sadeghi A, Raeisi M, Ebrahimi M, Sadeghi B. Antifungal activity of Pediococcus pentosaceus isolated from whole barley sourdough. J food Qual hazards Control. 2016;3(1):30-6.
9. AOAC. In official methods of analysis. Association of official analytical chemists. 17th ed. 2010.
10. Jones RJ, Hussein HM, Zagorec M, Brightwell G, Tagg JR. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. Food Microbiol. 2008;25(2):228-34. [DOI:10.1016/j.fm.2007.11.001] [PMID]
11. Yang E, Fan L, Jiang Y, Doucette C, Fillmore S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. Amb Express. 2012;2(1):48. [DOI:10.1186/2191-0855-2-48] [PMID] [PMCID]
12. Magnusson J, Schnürer J. Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Appl Environ Microbiol. 2001;67(1):1-5. [DOI:10.1128/AEM.67.1.1-5.2001] [PMID] [PMCID]
13. Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control. 2006;17(6):454-61. [DOI:10.1016/j.foodcont.2005.02.006]
14. Wang H, Yan Y, Wang J, Zhang H, Qi W. Production and characterization of antifungal compounds produced by Lactobacillus plantarum IMAU10014. PLoS One. 2012;7(1):e29452. [DOI:10.1371/journal.pone.0029452] [PMID] [PMCID]
15. Gürbüz I, Akyüz Ç, Yeşilada E, Şener B. Anti-ulcerogenic effect of Momordica charantia L. fruits on various ulcer models in rats. J Ethnopharmacol. 2000;71(1-2):77-82. [DOI:10.1016/S0378-8741(99)00178-6]
16. Gobbetti M. The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts. Trends Food Sci Technol. 1998;9(7):267-74. [DOI:10.1016/S0924-2244(98)00053-3]
17. Holzapfel WH, Wood BJB. Lactic acid bacteria in contemporary perspective. In: The genera of lactic acid bacteria. Springer; 1995. p. 1-6. [DOI:10.1007/978-1-4615-5817-0_1]
18. Katina K, Juvonen R, Laitila A, Flander L, Nordlund E, Kariluoto S, et al. Fermented wheat bran as a functional ingredient in baking. Cereal Chem. 2012;89(2):126-34. [DOI:10.1094/CCHEM-08-11-0106]
19. Şimşek Ö, Çon AH, Tulumoğlu Ş. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. Food Control. 2006;17(4):263-70. [DOI:10.1016/j.foodcont.2004.10.011]
20. Robert H, Gabriel V, Fontagné-Faucher C. Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. Int J Food Microbiol. 2009;135(1):53-9. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.006] [PMID]
21. Crowley S, Mahony J, Van Sinderen D. Comparative analysis of two antifungal L actobacillus plantarum isolates and their application as bioprotectants in refrigerated foods. J Appl Microbiol. 2012;113(6):1417-27. [DOI:10.1111/jam.12012] [PMID]
22. Rejiniemon TS, Hussain RR, Rajamani B. In-vitro functional properties of Lactobacillus plantarum isolated from fermented ragi malt. South Ind J Biol Sci. 2015;1(1):15-23. [DOI:10.22205/sijbs/2015/v1/i1/100437]

23. Di Biase M, Lavermicocca P, Lonigro SL, Valerio F. Lactobacillus brevis-based bioingredient inhibits Aspergillus niger growth on pan bread. Ital J Agron. 2014;146-51. [DOI:10.4081/ija.2014.614]

24. Manini F, Casiraghi MC, Poutanen K, Brasca M, Erba D, Plumed-Ferrer C. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. LWT-food Sci Technol. 2016;66:275-83. [DOI:10.1016/j.lwt.2015.10.045]

25. Coda R, Cassone A, Rizzello CG, Nionelli L, Cardinali G, Gobbetti M. Antifungal activity of Wickerhamomyces anomalus and Lactobacillus plantarum during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. Appl Environ Microbiol. 2011;77(10):3484-92. [DOI:10.1128/AEM.02669-10] [PMID] [PMCID]

26. Yan B, Zhao J, Fan D, Tian F, Zhang H, Chen W. Antifungal activity of Lactobacillus plantarum against Penicillium roqueforti in vitro and the preservation effect on Chinese steamed bread. J Food Process Preserv. 2017;41(3):e12969. [DOI:10.1111/jfpp.12969]