

میکروبی شناسی مواد غذایی



فهرست

ارزیابی ویژگی های میکروبی و فیتوشیمیایی نوشیدنی کفیر فراسودمند غنی شده با عصاره ریشه
جینسینگ قرمز

عرفان گل محمدیان ، مرجان نوری.....۳

ارزیابی ویژگی های پروبیوتیکی و ضد میکروبی مخمر غالب جدا شده از خمیر ترش جو

سارا شهریاری، فهیمه حاجی نیا، حسین پور عبدالله، مریم ابراهیمی، علیرضا صادقی.....۱۷

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم از محصولات لبنی سنتی

مریم کاظمی میرکی، الهام معظمیان، محمدجواد مختاری، مهرداد غلامزاد.....۳۷

فعالیت ضدباکتریایی شیر گاو تخمیر شده بوسیله دانه های کفیر علیه تعدادی از باکتریهای بیماریزا

هادی کوهساری ، سیده ثریا سجادی، عراز سلطان ساعدی فر، مریم صادق شش پلی.....۵۴

ارزیابی ویژگی های میکروبی و فیتوشیمیایی نوشیدنی کفیر فراسودمند غنی شده با عصاره ریشه

جینسینگ قرمز

عرفان گل محمدیان^۱، مرجان نوری^{۱*}

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران.

*نویسنده مسئول: Marjan.nouri@iau.ac.ir

چکیده

گروهی از میکروارگانیسم های همزیست از جمله مخمرها و باکتری های اسید لاکتیک نوشیدنی کفیر را تشکیل می دهند. هدف از پژوهش حاضر غنی سازی نوشیدنی کفیر با بکارگیری عصاره جینسینگ جهت تولید نوشیدنی فراسودمند و بهبود خواص سلامت بخشی آن بود. در این پژوهش نمونه های نوشیدنی کفیر فراسودمند شامل عصاره جینسینگ در سطوح غلظت مختلف (۰، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲ درصد) تولید شدند و آزمون های فیزیکوشیمیایی (pH، اسیدیته)، خصوصیات فیتوشیمیایی (آنتی اکسیدانی و میزان فنولیک کل)، شمارش میکروارگانیسم های زنده و سنجش آبگریزی سویه های میکروبی در مدت زمان ماندگاری ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز انجام شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد کاهش pH و افزایش اسیدیته در تمام نمونه های نوشیدنی کفیر طی روزهای ماندگاری ۲۱ روزه به طور قابل توجهی مشاهده شد ($p \leq 0/05$). غلظت بالاتر عصاره جینسینگ باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی (۷۰/۳۵ درصد) و محتوای فنول کل (۹۹/۶۰ درصد) شد. افزایش بقا و فعالیت باکتری های اسید لاکتیک (لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس و بیفیدیوباکتریوم) با افزودن عصاره جینسینگ مشخص شد در حالی که روند معکوس در ماندگاری طولانی مدت مشاهده شد ($p \leq 0/05$). بیشترین و کمترین درصد آبگریزی مربوط به گونه های لاکتوباسیلوس جدا شده از نمونه حاوی ۰/۸ درصد عصاره جینسینگ در روز اول (۷۰/۳ درصد) و گونه های بیفیدیوباکتریوم جدا شده از شاهد در روز بیست و یکم (۳۳/۵ درصد) است. نتایج کلی پژوهش حاضر نشان داد که سطوح قابل قبول عصاره جینسینگ (۰/۸ درصد) را می توان به عنوان ترکیبات نگهدارنده و آنتی اکسیدان طبیعی در نوشیدنی کفیر با توجه به اثرات مفید متعدد بر سلامت مصرف کنندگان، توصیه کرد.

کلید واژه ها: کفیر، فراسودمند، پروبیوتیک، جینسینگ، زنده مانی

مقدمه

محصولات لبنی مهمترین محصولات هستند که تولید آنها به شکل پروبیوتیک متداول است (Anvar and Nowruzzi, 2022). تخمیر لاکتیکی و الکلی شیر با دانه‌های کفیر یا کشت آغازگر نوشیدنی تخمیری مانند کفیر را تولید می‌کند که به دلیل ویژگی‌های ضد دیابت، التهابی و میکروبی خود مزایای سلامتی فراوانی دارد و میکروبیوتای روده را تنظیم می‌کند (Korzhev et al., 2015). باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان پروبیوتیک در کفیر ترکیبات ضد میکروبی مانند اسیدهای آلی، پپتیدهای ضد میکروبی، لانتی بیوتیک‌ها، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین‌ها را تولید می‌کنند (Moradi and Nouri, 2023). این گونه‌ها با کاهش رقابت ترکیبات مغذی، فعال شدن آنتاگونیستی و جلوگیری از چسبندگی عوامل بیماری‌زا به دیواره روده باعث کنترل عوامل بیماری‌زا می‌شوند (Pekcici et al., 2021). ویژگی آبریزی بر چسبندگی پروبیوتیک‌ها به دیواره روده تاثیر می‌گذارد و با افزایش این عامل کارایی پروبیوتیک‌ها بهبود می‌یابد (Barzegar et al., 2021).

با توجه به خواص مفید کفیر مورد توجه بسیاری از کشورهای مختلف در سراسر جهان قرار گرفته است (Nouri and Khodaiyan, 2020; Pekcici et al., 2021). ویژگی همزیستی در بین مخمرها، اسید استیک و باکتری‌های اسید لاکتیک مشاهده می‌شود که بر درک طعم و کیفیت تولید کفیر تاثیر می‌گذارد (Anvar and Nowruzzi, 2022). پروتئین (۲/۷ درصد)، اسید لاکتیک (۰/۶ درصد) و چربی (۱۰ درصد) مربوط به شیر در کفیر مشاهده می‌شود (Pekcici et al., 2021).

با توجه به تحقیقات قبلی وضعیت تغذیه‌ای نوشیدنی کفیر با استفاده از ترکیبات متمایز از جمله بذر کتان (۱ درصد وزنی/حجمی)، اسانس رزماری (۰/۱۵ درصد وزنی/حجمی) و شیر فندق (۲۵-۵۰-۷۵ درصد وزنی/حجمی)، هویج سیاه (۱۰ تا ۲۵ درصد) و عدس قهوه‌ای (۲ درصد وزنی/حجمی) بهبود یافته است که تاثیر مثبتی بر فعالیت‌های هیپوگلیسمی، ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و بقای میکروبی داشتند (Gunenc et al., 2017; Kim et al., 2017; Perna et al., 2019; Kabakci et al., 2020).

جینسینگ از خانواده عشقه (Araliaceae) بوده که با نام علمی *Panax ginseng* شناخته شده است (Ardalanian and Fadaei, 2018). گیاه و ریشه جینسینگ قرمز و سفید دارویی سنتی و آسیایی است که قرن‌ها جهت بهبود سلامت، کاهش چربی، ضد دیابت، ضد خستگی، ضد استرس، ضد سرطان، بهبود حافظه و سیستم‌های ادراکی، مهار رشد سلول‌های تومور و درمان اختلالات جنسی مورد استفاده قرار گرفته است (Kim et al., 2022). ترکیبات شیمیایی مختلف جینسنگ سفید و جینسنگ قرمز می‌تواند منجر به برهمکنش‌ها و فعالیت‌های بیولوژیک متنوع شود و نتایج نشان داده است خصوصیات عملکردی و زیستی جینسنگ قرمز مطلوب تر است (He et al., 2018). ترکیبات شیمیایی ریزوم جینسینگ عبارت از گلیکوزیدهای استروئیدی به نام پاناکیلون، یک ساپونین به نام پاناکسوزید، مواد صابونی، اسانس روغنی فرار به نام پاناسین، ویتامین‌های گروه B، روی، استرول و گلیکوزیدی به نام جینسیونوزید است (Safari et al., 2020).

استفاده شد. سدیم هیدروکسید از شرکت فلوکا (ایالات متحده آمریکا) و سایر ترکیبات شیمیایی از جمله اسید سولفوریک، ایزوآمیل الکل، فنول فتالین، سدیم سولفات، متانول، هگزان و محیط کشت ام آر اس (دی من، روگوسا و شارپ آگار) از شرکت مرک (آلمان) و استانداردهای متیل استر اسید چرب از سیگما (Supelco™ 37 جزء اسید چرب متیل استر مخلوط، Oakville، ON، کانادا) تهیه شد.

استخراج عصاره جینسینگ

جهت تهیه عصاره آبی ریشه جینسینگ قرمز، ابتدا ریشه توسط مخلوط کن (Kenwood) آسیاب و پودر شد، سپس به مدت ۵ ساعت در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در آب (چهار برابر وزن پودر) خیسانده و صاف گردید. در مرحله بعد تبخیر (تا ۶۰ درصد ماده خشک) در خلاء در دمای ۴۵ درجه سلسیوس انجام شد (Ardalanian and Fadaei, 2018).

تهیه نمونه‌های نوشیدنی کفیر

شیر پاستوریزه و هموژنیزه شده تا دمای ۲۲ درجه سلسیوس خنک، با دانه‌های کفیر ۳ درصد (حجمی/حجمی) تلقیح و به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط شد. سپس عصاره جینسینگ در سطوح مشخص برای تلقیح شیر اضافه و نمونه‌های به دست آمده در بطری‌های شیشه‌ای بسته‌بندی شدند. بطری‌ها در دمای ۴۲ درجه سلسیوس تا رسیدن به اسیدیته مورد نظر گرمخانه گذاری شدند، سپس به دمای ۴ درجه سلسیوس رسیدند. نمونه‌ها به صورت CK، GK_{0.4}، GK_{0.8} و GK_{1.2} به ترتیب برای ۰، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ درصد عصاره جینسینگ بیان شدند و آزمایش نوشیدنی‌ها در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ ماندگاری بررسی شد.

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

pH به صورت پتانسیومتری با استفاده از یک pH متر اندازه گیری شد (مجموع pH ۷ یون Schwerzenbach, S220).

در بررسی تحقیقات پیشین نشان داده شد که از عصاره جینسینگ قرمز (۰ تا ۲ گرم بر لیتر) و پودر جینسینگ (۰ تا ۲ درصد وزنی/حجمی) به ترتیب در دوغ پروبیوتیک (حاوی Lactobacillus acidophilus La5 و Bifidobacterium lactis BB12) و ماست پروبیوتیک (حاوی Lactobacillus plantarum NK181) بکار رفته است و بهترین تیمار برای زنده ماندن باکتری‌های پروبیوتیک در هر دو پژوهش غلظت ۱ گرم بر لیتر و ۱ درصد حاصل شده است (Ardalanian and Fadaei, 2018; Jang et al., 2018). همچنین از ترکیبات عدس قهوه‌ای (Gunenc et al., 2017)، پودر سیر لیوفیلیزه (Kim et al., 2017)، عصاره دارچین (Setiyoningrum et al., 2019)، آب انار (Dimitreli et al., 2019)، اسانس رزماری (Perna et al., 2019)، عسل (Perna et al., 2019)، هویج سیاه (Kabakci et al., 2020) و آب پنیر سویا (Turek and Wszolek, 2022) جهت بهبود خصوصیات کیفی نوشیدنی کفیر استفاده شده است. اما تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد تأثیر بکارگیری عصاره جینسینگ قرمز بر نوشیدنی کفیر یافت نشده است. پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر عصاره جینسینگ در نوشیدنی‌های کفیر با غلظت‌های ۰، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ درصد بر برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی (pH و اسیدیته قابل تیتراسیون)، فیتوشیمیایی (ترکیبات فنولی کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی)، بقای میکروبی و آبگریزی میکروارگانسیم‌های کفیر غنی شده انجام شد.

مواد و روش

شیر از شرکت لبنیات کاله (ایران، آمل) با ۲/۵ درصد چربی و ریشه جینسینگ قرمز کره جنوبی از بازار محلی آمل خریداری شد. دانه‌های کفیر به عنوان یک کشت آغازگر تهیه و از بطری‌های شیشه‌ای جهت حفظ نوشیدنی کفیر فراسودمند

تعیین شمارش میکروارگانیزم های زنده

پس از حداکثر رقت سریالی تعداد گونه لاکتوباسیلوس (محیط ام آر اس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت)، لاکتوکوکوس (محیط ام آر ۱۷ در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ ساعت)، بیفیدوباکتریوم (محیط ام آر اس- نالیدیکسیک اسید، نئومایسین سولفات، لیتیم و پارومومایسین سولفات در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت) و واحدهای تشکیل کلنی در نمونه‌های کفیر تعیین شد. شمارش مخمر زنده به صورت شمارش واحدهای تشکیل کلنی در محیط آگار محاسبه شد که شامل ۰/۵ درصد مخمر، ۱ درصد گلوکز، ۱/۵ درصد آگار و ۰/۵ درصد پلی پیتون بود و قبل از شمارش پلیت‌های آگار در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند (Turek and Wszolek, 2022).

سنجش آگریزی سوبه‌های میکروبی کفیر

ابتدا رقت نمونه‌های کفیر تعیین و با استفاده از روش پورپلیت گرمخانه گذاری شد. سپس گونه لاکتوباسیلوس (محیط ام آر اس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت)، لاکتوکوکوس (محیط ام آر ۱۷ در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ ساعت) و بیفیدوباکتریوم (محیط ام آر اس- نالیدیکسیک اسید، نئومایسین سولفات، لیتیم و پارومومایسین سولفات در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت) تا زمانی که OD₀ به ۰/۶ تا ۰/۷ برسد کشت داده شدند. مقدار ۳ میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی به ۱ میلی لیتر n-هگزادکان اضافه و گرمخانه گذاری در ۱۵ دقیقه انجام شد. لوله‌های حاوی نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه به شدت مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گرمخانه گذاری شدند، در نهایت OD₀ اندازه گیری و برای تعیین آگریزی از رابطه ۲ استفاده شد (Barzegar et al., 2021):

سوئیس) و اسیدیته به صورت گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر در اسید لاکتیک بی آب بیان شد که بر اساس AOAC (2000) تعیین شد.

ارزیابی پتانسیل مهار رادیکال DPPH

ویژگی آنتی اکسیدانی با اندازه گیری پایداری مهار رادیکال آزاد DPPH (۲، ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل) توصیف شد. در روش حاضر نمونه ۱۰۰ میکرولیتری با ۳/۹ میلی لیتر DPPH (۰/۰۲۲۷ گرم بر لیتر متانول) مخلوط و طی مدت ۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شد. متانول به صورت بلانک اعمال شد و پس از سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰ × g) جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر تشخیص داده شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH از طریق رابطه ۱ تعیین شد:

$$\text{DPPH: } \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100 = \text{درصد میزان مهار} \quad (1)$$

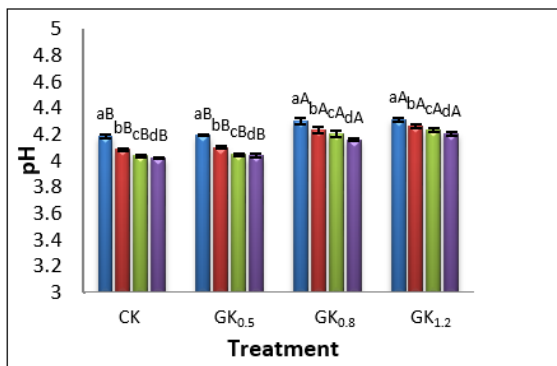
مقادیر جذب برای نمونه‌های بلانک و فرآیند شده به ترتیب به صورت A₀ و A₁ بیان شد (Basiri and Nouri, 2021).

سنجش محتوای فنول کل

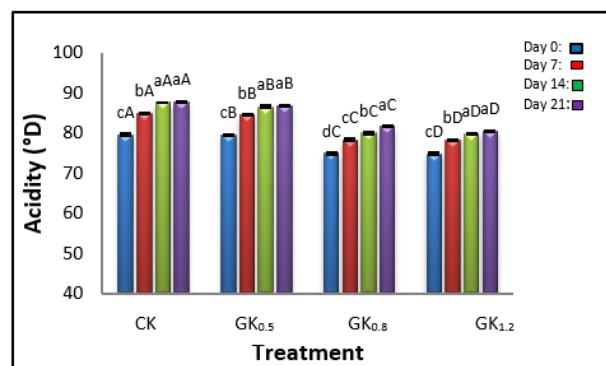
کل ترکیبات فنولی نوشیدنی کفیر با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. به طور خلاصه ۱ میلی لیتر از هر نمونه به ۶ میلی لیتر آب دیونیزه و ۰/۵ میلی لیتر از معرف N ۱ فنول فولین سیوکالتیو اضافه شد. سپس مخلوط به مدت ۵ دقیقه نگهداری و ۱ میلی لیتر سدیم کربنات به آن افزوده شد. پس از ۱ ساعت تاریکی جذب در طول موج ۷۲۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری (ایالات متحده آمریکا، Thermo Scientific, Madison, WI) محاسبه و رابطه منحنی استاندارد فنولی کل رسم شد (Ardalanian and Fadaei, 2018).

خصوصیات فیزیکوشیمیایی

pH نوشیدنی‌های کفیر در طول بیست و یک روز ماندگاری کاهش یافت (شکل ۱a). بیشترین و کمترین pH به ترتیب ۴/۲۸ برای GK_{1.2} (روز اول) و ۴/۰۲ برای CK (روز بیست و یکم) هنگام تولید حاصل شد. لازم به ذکر است که تفاوت معنی داری بین نمونه‌ها در روزهای چهاردهم و بیست و یکم مشاهده نشد ($p > 0.05$). مقدار pH نوشیدنی‌های کفیر طی دوره گرمخانه گذاری کاهش و اسیدیته قابل تیتراسیون افزایش یافت ($p < 0.05$), این نتایج نشان داد که تغییرات pH و اسیدیته قابل تیتراسیون با یکدیگر همبستگی دارند.



شکل ۱ (الف)



شکل ۱ (ب)

شکل ۱- تاثیر غلظت های مختلف عصاره جینسینگ (۰ درصد: CK, ۰/۴ درصد: GK_{0.4}, ۰/۸ درصد: GK_{0.8} و ۱/۲ درصد

GK_{1.2}) بر فاکتورهای pH (شکل ۱ الف) و اسیدیته (شکل ۱ ب) نوشیدنی‌های کفیر در مدت زمان ماندگاری ۲۱ روز

بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی برای GK_{1.2} با ۷۰/۳۵ درصد در روز اول و کمترین ۲۹/۰۹ درصد برای گروه شاهد در روز بیست و یکم مشاهده شد.

ارزیابی بیولوژیکی

ویژگی‌های بیولوژیکی نمونه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است و فعالیت آنتی اکسیدانی با افزودن عصاره مانند GK_{0.8} و GK_{1.2} افزایش یافته است که در تضاد با تخمیر طولانی بود.

$$100 \times \frac{(OD_0 - OD)}{OD_0} = \text{درصد آبگریزی: رابطه ۲}$$

تجزیه تحلیل آماری

از آزمون نرمال بودن استفاده و پس از آن طرح فاکتوریل به صورت کامل و تصادفی در سه تکرار با میانگین و انحراف معیار انجام شد. بنابراین ۰، ۰/۴، ۰/۸ و ۱ درصد عصاره جینسینگ به ترتیب در روزهای ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ ماندگاری نشان داده شد. آزمون چندگانه دانکن در سطح ۰/۰۵ و تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار Minitab نسخه ۱۵ انجام شد.

نتایج

جدول ۱ - تاثیر غلظت های مختلف عصاره جینسینگ (۰ درصد: CK، ۰/۴ درصد: GK_{0.4}، ۰/۸ درصد: GK_{0.8} و ۱/۲ درصد: GK_{1.2}) بر آزمون های آنتی اکسیدانی و ترکیبات فنولیک نوشیدنی های کفیر در مدت زمان ماندگاری ۲۱ روزه تفاوت معنی داری در هر سطر با حروف انگلیسی بزرگ نشان داد شده است.

فعالیت آنتی اکسیدانی (درصد)					
تیمارها	غلظت عصاره	روز صفر	روز هفتم	روز چهاردهم	روز بیست و یکم
جینسینگ (درصد)					
CK	.	dA۴۵/۰±۳۲/۱۴	dB۳۹/۰±۹۱/۵۴	dC۳۳/۰±۸۳/۵۵	dD۲۹/۰±۰۹/۳۱
GK _{0.4}	۰/۴	cA۵۴/۰±۶۱/۳۸	cB۴۳/۰±۴۲/۱۸	cC۳۵/۰±۲۱/۱۳	cD۳۰/۰±۹۷/۳۲
GK _{0.8}	۰/۸	bA۶۸/۰±۳۳/۸۸	bB۵۳/۰±۰۲/۲۹	bC۴۴/۰±۳۶/۳۸	bD۳۶/۰±۴۳/۰۸
GK _{1.2}	۱/۲	aA۷۰/۰±۳۵/۵۶	aB۵۷/۰±۵۹/۱۹	aC۴۸/۰±۳۲/۵۴	aD۴۱/۰±۹۴/۴۳
محتوای فنولیک کل (درصد)					
CK	.	dA۶۰/۰±۵۲/۹۷	dB۵۵/۰±۲۱/۲۸	dC۵۲/۰±۱۴/۵۳	dD۴۸/۰±۲۰/۳۰
GK _{0.4}	۰/۴	cA۷۲/۱±۷۹/۴۷	cB۶۲/۰±۳۰/۵۵	cC۵۶/۰±۸۳/۲۵	cD۴۹/۰±۸۷/۴۷
GK _{0.8}	۰/۸	bA۸۶/۰±۷۱/۷۱	bB۷۸/۰±۵۳/۷۳	bC۷۱/۰±۵۳/۴۵	bD۶۰/۰±۲۵/۴۳
GK _{1.2}	۱/۲	aA۹۹/۶±۲۴/۷۶	aB۰/۴۳±۹۹/۱۱	aC۸۶/۰±۰۳/۹۳	aD۶۹/۰±۸۸/۸۴

تفاوت معنی داری در هر ستون با حروف انگلیسی کوچک نشان داد شده است.

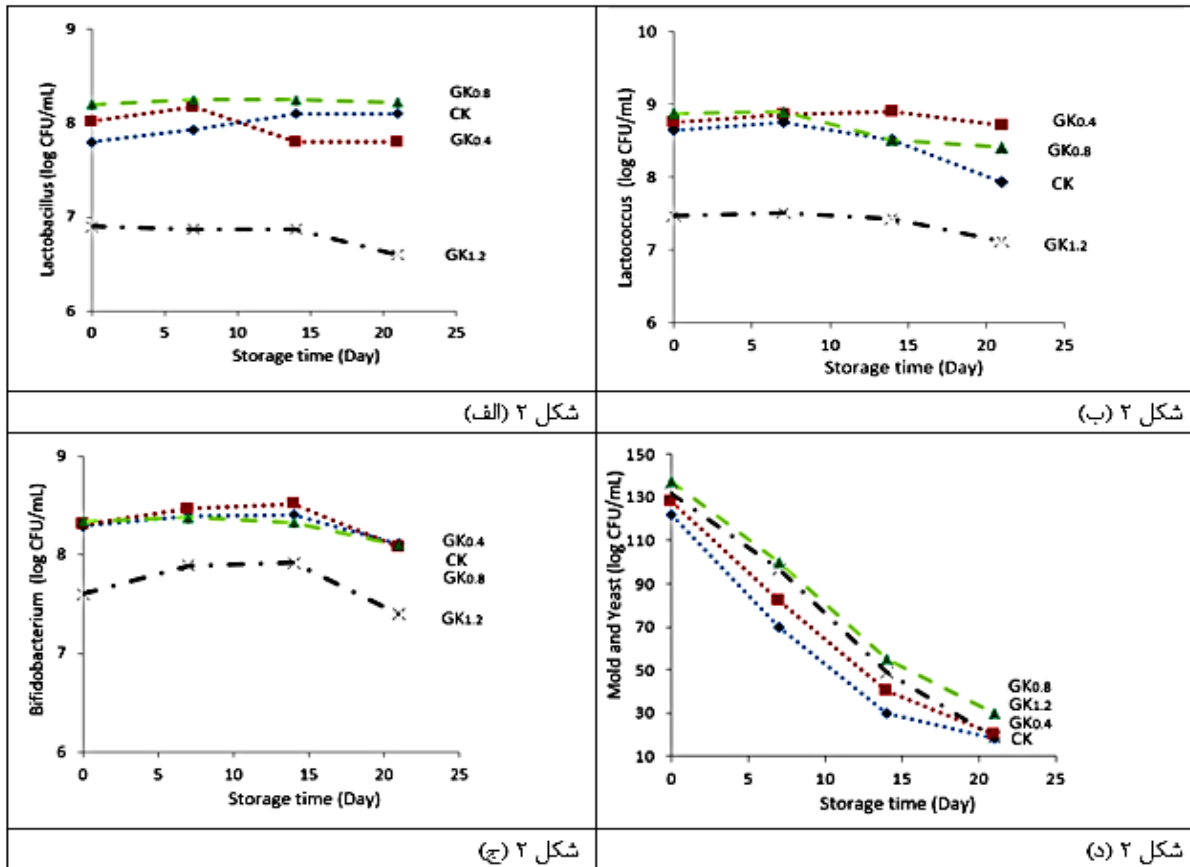
نتایج شمارش باکتری اسید لاکتیک در شکل ۲ نشان داده شده است، بیشترین تعداد گونه های لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکس و بیفیدوباکتریوم ۸/۲۲، ۸/۹۰ و ۲۸/۱ (log CFU/mL) برای GK_{0.8} در روز هفتم بود. اثر ماندگاری بر تعداد باکتری ها بررسی شد و می توان نتیجه گرفت که تعداد میکروارگانیسم ها تا روز چهاردهم تغییر معنی داری نداشت، اما پس از آن روند کاهشی در روز بیست و یکم مشاهده شد. نتایج شمارش کپک و مخمر در شکل ۲ (د) ارائه شده است، بیشترین میزان کپک و مخمر (حدود ۱۳۱ CFU/mL) برای GK_{0.8} در روز اول و کمترین (حدود ۱۷ CFU/mL) برای

همچنین جدول ۱ تغییرات ترکیبات فنولی کل نمونه های تخمیر شده متمایز را در طی ۲۱ روز تخمیر نشان می دهد (p<۰/۰۵). GK_{1.2} دارای بالاترین ۱۰۰/۲۴ (میلی گرم معادل اسید گالیک در هر گرم) ترکیبات فنولی کل و کمترین سطح آن ۴۸/۲۰ (میلی گرم معادل اسید گالیک در هر گرم) در CK ارائه شد. در یک زمان ثابت GK_{0.8} و GK_{1.2} ترکیبات فنولی کل بالاتری در مقایسه با CK و GK_{0.4} نشان دادند، همچنین ترکیبات فنولی کل با افزایش تخمیر کاهش یافت.

زنده مانی باکتری اسید لاکتیک، کپک و مخمر

بیشترین تعداد آنها در روز اول در تمامی نمونه‌ها و کمترین تعداد در روز بیست و یکم تخمیر به دست آمد.

CK در روز بیست و یکم گرمخانه گذاری بود. به طور کلی اثر زمان ماندگاری بر تعداد مخمر معنی دار بود به طوری که

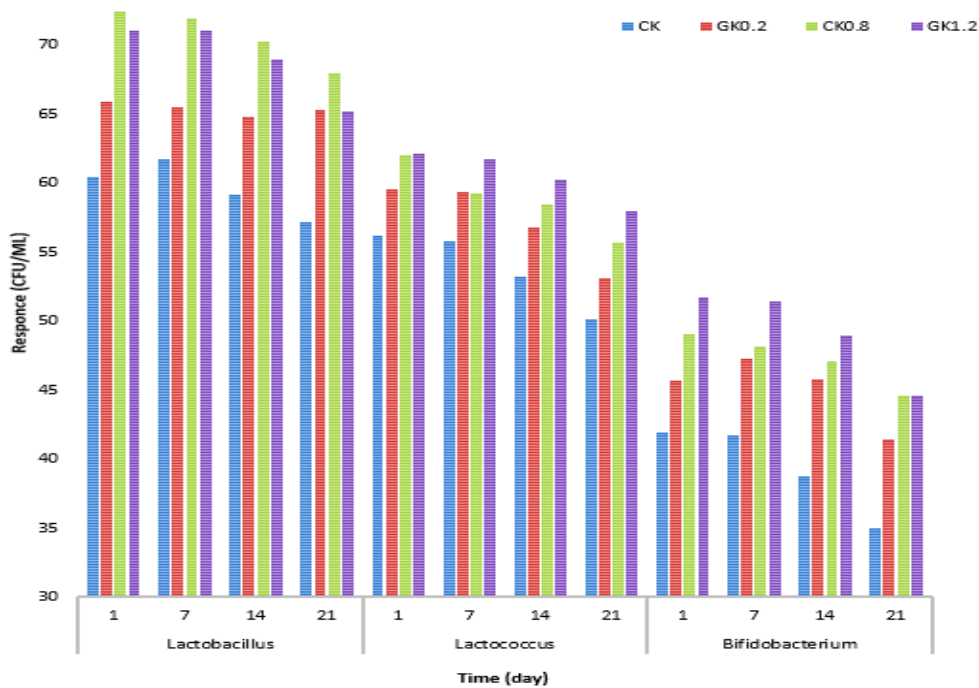


شکل ۲- تاثیر غلظت های مختلف عصاره جینسینگ (۰ درصد: CK, ۰/۴ درصد: GK0.4, ۰/۸ درصد: GK0.8 و ۱/۲ درصد: GK1.2) بر زنده مانی میکروارگانیسم های موجود در نوشیدنی های کفیر در مدت زمان ماندگاری ۲۱ روزه

درصد) است. آبگریزی گونه های لاکتوباسیلوس در همه نمونه ها نسبت به سایرین بیشتر است، درصد آبگریزی کفیر حاوی عصاره بیشتر از بدون آن است و تا روز چهاردهم اثر قابل توجهی روی آبگریزی مشاهده نمی شود، اما کاهش قابل توجهی از آبگریزی در روز بیست و یکم مشخص شده است.

خصوصیت آبگریزی

همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود، بیشترین و کمترین درصد آبگریزی مربوط به گونه های لاکتوباسیلوس جدا شده از GK0.8 در روز اول (۷۰/۳ درصد) و گونه های بیفیدیوباکتریوم جدا شده از CK در روز بیست و یکم (۳۳/۵



شکل ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره جینسینگ (۰ درصد: CK، ۰/۴ درصد: GK0.2، ۰/۸ درصد: GK0.8 و ۱/۲ درصد: GK1.2) بر خاصیت آبگریزی باکتری‌های لاکتیکی موجود در نوشیدنی‌های کفیر در مدت زمان ماندگاری ۲۱ روزه

جمعیت میکروبی در نوشیدنی‌های کفیر ایجاد می‌شود (Korzhev et al., 2015).

اسیدیته قابل تیتراسیون نوشیدنی‌های کفیر تولید شده از شیر غنی شده با عصاره جینسینگ در شکل ۱b ارائه شده است. بیشترین اسیدیته برای CK ($D^{\circ} 87/96$) و کمترین مقدار برای GK1.2 ($D^{\circ} 74/02$) به ترتیب در روز بیست و یکم و تولید ثبت شد، همچنین اسیدیته طی نگهداری افزایش معنی داری داشت و CK و GK0.4 بالاترین سطح را نشان دادند ($p < 0/05$). اسیدیته با افزودن ۱ درصد (وزنی/حجمی) پودر سیر لیوفیلیزه (Kim et al., 2017) و ۳ درصد (وزنی/وزنی) عسل (Perna et al., 2019) کاهش و همچنین با استفاده از ۲ درصد (وزنی/حجمی) عدس قهوه‌ای (Gunenc et al., 2017) و ۱۵ درصد (وزنی/وزنی) آب انار (Dimitreli et

بحث

pH از ۴/۴۷ به ۴/۵۸ با افزودن ۱ درصد (وزنی/حجمی) پودر سیر لیوفیلیزه (Kim et al., 2017)، از ۴/۳۱ به ۴/۳۶ با استفاده از ۱۰ تا ۲۵ درصد هویج سیاه (Kabakcı et al., 2020) از ۳/۷۹ تا ۳/۸۴ با ۴ درصد عصاره های دارچین (Setiyoningrum et al., 2019) در نوشیدنی کفیر افزایش یافت که در راستای تحقیق حاضر بود. با این حال محدوده pH از ۴/۳۱ به ۴/۲۴ در نوشیدنی کفیر با افزودن ۱۰ درصد توت سیاه، انار و توت فرنگی کاهش یافت (Kabakcı et al., 2020) که برخلاف پژوهش حاضر بود. تغییرات pH اسیدیته عمدتاً به تولید اسیدهای آلی خاص، اتانول، دی اکسید کربن و سایر ترکیبات فرار مرتبط است که در اثر

کل ترکیبات فنولیک از محدوده ۲۴ به ۶۵ (میلی گرم اسید گالیک/ ۱۰۰ گرم) در روز اول ماندگاری افزایش یافت که این روند مشابه تحقیق حاضر بود. نتایج نشان داد تعداد باکتری اسید لاکتیک با وجود سوبسترای کمتر (لاکتوز) و همچنین اثر مهار کنندگی عصاره، کاهش یافت که همراستا با نتایج محققان پیشین بود (Sah et al., 2016). طی تلقیح کشت آغازگر میکروارگانیسم‌ها، لاکتوز را به باکتری‌های اسید لاکتیک، الکل و دی اکسید کربن به عنوان متابولیت‌های ثانویه تخمیر کردند که رشد آنها را به دلیل کاهش نسبت لاکتوز به اسید لاکتیک محدود می‌کند (Korzhev et al., 2015). اشکال گیاهی غنی شده (عصاره، اسانس و غیره) با پلی فنول‌ها و سایر ترکیبات ضد میکروبی مانند ساپونین‌ها به عنوان عوامل بازدارنده عمل کرده و رشد میکروبی را کاهش می‌دهند (Safari et al., 2020). آگزوپلی ساکارید کفیران بر رشد میکروبی و پتانسیل اکسایش-کاهش توسط باکتری‌های اسید لاکتیک تاثیر می‌گذارد همچنین سلول‌های میکروبی را با یک لایه نازک پوشانده و انتقال اکسیژن را کاهش می‌دهد (Korzhev et al., 2015). تعداد کپک و مخمر به طور کلی در محصولات لبنی تخمیر شده به ویژه کفیر بیشتر از فلور طبیعی باکتریایی است که به رشد سریع مربوط می‌شود (Pekcici et al., 2021). بر این اساس بیشترین میزان کپک و مخمر در نوشیدنی کفیر در ابتدای ماندگاری به دلیل وجود لاکتوز بیشتر مشاهده شد، اما با گذشت زمان از جمعیت آنها کاسته شد (Sah et al., 2016). مخمرها به عنوان یک عامل کلیدی در تهیه محصولات لبنی تخمیری در نظر گرفته می‌شوند که ترکیبات مغذی ضروری رشد مانند ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه، pH، اتانول و دی اکسید کربن را تامین می‌کنند. مخمرهای موجود در کفیر به وضوح محیطی مساعد برای

(al., 2019) در نوشیدنی کفیر افزایش یافت که مشابه تحقیقات ما بود. شیر و مشتقات آن دارای آنتی اکسیدان‌هایی مانند لاکتوفرین، بتا لاکتوگلوبولین و آلبومین سرم گاو است (Kabakcı et al., 2020). این مطالعه نشان داد که کفیر غنی شده دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی است که با یافته‌های قبلی مطابقت دارد (Nouri and Khodaiyan., 2020; Setiyoningrum et al., 2019). پلی استایرن (عمدتا کفیران) حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک، دارای گروه‌های عاملی متمایز (OH، COOH، و CO-) بود که با رادیکال‌های آزاد واکنش داده و در نهایت از بین خواهد رفت که نشان دهنده نقش آنتی اکسیدانی آن است (Korzhev et al., 2015). نتایج پژوهش‌های قبلی نشان داد که ۳۰ درصد (وزنی/حجمی) عسل (Perna et al., 2019)، ۱۵/۰ درصد (وزنی/حجمی) اسانس رزماری (Perna et al., 2019)، ۸ درصد (حجمی/حجمی) دارچین (Setiyoningrum et al., 2019) و ۵ درصد (وزنی/حجمی) آب پنیر سویا (Turek and Wszolek, 2022) فعالیت آنتی اکسیدانی برتر کفیر را نشان می‌دهند که مطابق با مطالعه ما بودند. پلی فنول‌ها با پروتئین‌های شیر تعامل دارند و ترکیب نامحلولی را تشکیل می‌دهند که پلی فنول کل آزاد را کاهش می‌دهد (Entezari and Nouri, 2022). از سوی دیگر احتمال اثر باکتری‌های لاکتیکی بر متابولیزه کردن عصاره هدف و تاثیر هم افزایی پپتیدهای حاوی پرولین بر خاصیت آنتی اکسیدانی پلی فنول‌ها نیز وجود دارد (Kabakcı et al., 2020; Setiyoningrum et al., 2019). محتوای فنولی کل کفیر با افزودن ۲۰ درصد (وزنی/وزنی) عصاره آبی توت خشک و ۲ درصد (وزنی/حجمی) عدس قهوه‌ای (Gunenc et al., 2017) بهبود یافت بدین صورت که میزان

بنابراین قابلیت چسبندگی به سطوح سلول‌های اپیتلیال یکی از مهم‌ترین شرایط انتخاب پروبیوتیک است (Wu and Shah, 2015). ترکیبات محیط کشت میکروارگانیسم‌ها اثر زیادی در تغییر دیواره سلولی و عملکرد آن دارد، اثر ترکیبات محیط کشت بر روی میکروارگانیسم‌ها در تحقیقات مختلف مشاهده شده است (Barzegar et al., 2021). اثرات اسید الایدیک بر رشد و آگریزی سطح لاکتوباسیلوس بررسی شد، نتایج نشان داد که الایدیک اسید خواص فیزیکیوشیمیایی سطحی لاکتوباسیلوس را تغییر می‌دهد (Wu and Shah, 2015).

نتیجه گیری کلی

عصاره جینسینگ بر ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و میکروبیولوژیکی نوشیدنی‌های کفیر تاثیر معنی‌داری گذاشته است بدین صورت که غلظت بالاتر عصاره ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و سطح ترکیبات فنولی کل بیشتری را نمایش داد. همچنین همبستگی منفی بین ترکیبات فنولی کل، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و زنده مانی باکتری‌های اسید لاکتیک در نوشیدنی‌های کفیر غنی شده با عصاره جینسینگ مشاهده شد. آگریزی گونه‌های لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس و بیفیدوباکتریوم جدا شده از نمونه‌های کفیر غنی شده با عصاره نسبت به نمونه شاهد افزایش یافته است که نشان‌دهنده بهبود کارایی آنها در دستگاه گوارش انسان است. بنابراین سطوح قابل قبول عصاره را می‌توان به عنوان نگهدارنده و آنتی‌اکسیدان طبیعی به ویژه در محصولات لبنی پروبیوتیک استفاده کرد که اثرات مفید متعددی بر سلامت انسان دارد.

متابولیت‌های تولیدکننده رشد باکتری‌ها فراهم می‌کنند که به طعم و احساس دهانی کمک می‌کنند (Korzhev et al., 2015). در پژوهش‌های پیشین ۲ درصد (وزنی/حجمی) عدس قهوه‌ای به دلیل داشتن فیبر و ترکیبات فنولیک (Gunenc et al., 2017)، بذر کتان ۱ درصد (وزنی/حجمی) با مقادیر بالای پکتین بعنوان سوپسترا واکنش‌های آنزیمی و پری‌بیوتیک باکتری‌های اسید لاکتیک (Kim et al., 2017) و ۵ (وزنی/حجمی) آب پنیر سویا با داشتن ترکیبات مغذی کافی برای حمایت از رشد باکتری‌ها (Tu et al., 2019) بکار رفته‌اند که منجر به رشد و بقای بالاتر گونه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک شده‌اند که نتایج آنها مشابه مطالعه حاضر می‌باشد. عصاره زنجبیل و دارچین به کفیر شیر بز اضافه شد که باکتری‌های اسید لاکتیک را از 1×10^{10} برای کفیر بدون عصاره به 9×10^9 با ۸ درصد عصاره دارچین و $3/2 \times 10^9$ با ۱۲ درصد عصاره زنجبیل کاهش داد (Setiyoningrum et al., 2019).

عوامل متعددی بر ویژگی آگریزی مانند خواص شیمیایی و ساختار باکتری‌ها مانند پروتئین، اسید آمینه، پلی‌ساکارید و ترکیبات لیپیدی در سلول‌ها، عوامل محیطی و رشد باکتری‌ها تاثیر می‌گذارند (Barzegar et al., 2021). آگریزی سطح سلول توسط محققان قبلی ۵۰/۳۲ تا ۷۷/۸ درصد گزارش شده است (Somashekaraiah et al., 2019). عوامل مختلفی در چسبندگی پروبیوتیک‌های مختلف به سلول‌های روده نقش دارند که می‌توان به خواص آگریزی و آب دوستی غشای سلولی میکروارگانیسم‌ها اشاره کرد. محیط‌های کشت مختلف بر اسیده‌های چرب غشا سلولی تاثیر می‌گذارند و اثرات آنها آگریزی و آب دوستی غشای سلولی را تغییر می‌دهد.

منابع

1. Anvar A.A. and Nowruzi B. 2022. A review of the use of cyanobacteria in increasing effects of prebiotic and probiotic on food. JFM. 9(3): 1-18
2. AOAC. 2000. Official methods of analysis. 17th edition. The association of official analytical chemists, Gaithersburg, MD, USA.
3. Ardalanian F. and Fadaei V. 2018. Production of probiotic dough enriched with red ginseng extract. J Agric Sci Technol. 20(2): 277-287.
4. Barzegar H., Alizadeh Behbahani B. and Falah F. 2021. Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of Lactobacillus strains isolated from Iranian raw milk cheeses. Food Sci Nutr. 9(8): 4094-4107.
5. Basiri M. and Nouri M. 2021. Enrichment of strawberry frozen yogurt by chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. Food and Health. 4(4): 28-34.
6. Dimitreli G., Petridis D., Kapageridis N. and Mixiou M. 2019. Effect of pomegranate juice and fir honey addition on the rheological and sensory properties of kefir-type products differing in their fat content. LWT. 111: 799-808 .
7. Entezari E. and Nouri M. 2022. Improving stability of bioactive components and folate and survival of Bifidobacterium Bifidum and Bifidobacterium Lactis in probiotic ice creams containing Japanese loquat pulps. Nutr Food Sci. 9(1): 49-56.
8. Gunenc A., Yeung M.H., Lavergne C., Bertinato J. and Hosseinian F. 2017. Enhancements of antioxidant activity and mineral solubility of germinated wrinkled lentils during fermentation in kefir. J Funct Foods. 32: 72-79.
9. He M., Huang X., Liu S., Guo C., Xie Y., Meijer A.H. and Wang M. 2018. The difference between white and red ginseng: Variations in ginsenosides and immunomodulation. Planta Med. 84(12): 845-854.
10. Jang H.J., Jung J., Yu H.S., Lee N.K. and Paik H.D. 2018. Evaluation of the quality of yogurt using ginseng extract powder and probiotic Lactobacillus plantarum NK181. Korean J Food Sci Anim Resour. 38(6): 1160-1167.
11. Kabakcı S.A., Türkyılmaz M. and Özkan M. 2020. Changes in the quality of kefir fortified with anthocyanin-rich juices during storage. Food chem. 326: 126977.
12. Kim D.H., Jeong D., Oh Y.T., Song K.Y., Kim H.S., Chon J.W., Kim H. and Seo K.H. (2017). Stimulating the growth of kefir-isolated lactic acid bacteria using addition of crude flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) extract. J Dairy Sci Biotechnol. 35(2): 93-97.
13. Kim H., Lee Y.S., Yu H.Y., Kwon M. and Kim K.K. In G. Hong S.K and Kim S.K. 2022. Anti-inflammatory effects of *Limosilactobacillus fermentum* KGC1601 isolated from panax ginseng and its probiotic characteristics. Foods. 11: 1707.
14. Korzhov R., Ponomarev A., Melnikova E. and Bogdanova E. 2015. Preclinical studies of kefir product with reduced allergenicity of β -lactoglobulin. Foods Raw Mater. 3(2): 115-121.
15. Moradi S. and Nouri M. 2023. Production of functional kefir supplemented by *Portulaca oleracea* L.

- seed oil. *J. Food Meas. Charact.* 17(5): 3264 - 3271.
16. Nouri M. and Khodaiyan F. 2020. Magnetic biocatalysts of pectinase: Synthesis by macromolecular cross-linker for application in apple juice clarification. *Food Technol Biotechnol.* 58(4): 391-401.
 17. Pekcici M.E., Guler E. and Topkafa M. 2021. Biogenic amine contents in Turkish dairy products: determination and comparison. *J Food Meas Charact.* 15(5): 4119-4127.
 18. Perna A., Simonetti A. and Gambacorta E. 2019. Phenolic content and antioxidant activity of donkey milk kefir fortified with sula honey and rosemary essential oil during refrigerated storage. *Int J Dairy Technol.* 72(1): 74-81.
 19. Safari M., Gholamzadeh A., Asadi A. and Mahjoor M. 2020. The therapeutic and anti-inflammatory effects of ginseng in multiple sclerosis patients. *RJMS.* 27 (2) :61-69.
 20. Sah B.N.P., Vasiljevic T., McKechnie S. and Donkor O. 2016. Physicochemical, textural and rheological properties of probiotic yogurt fortified with fibre-rich pineapple peel powder during refrigerated storage. *LWT.* 65: 978-986.
 21. Setiyoningrum F., Priadi G. and Afiati F. 2019. Supplementation of ginger and cinnamon extract into goat milk kefir. *AIP Conf Proc.* 2175: 020069.
 22. Somashekaraiah R., Shruthi B., Deepthi B. and Sreenivasa M. 2019. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from neera: a naturally fermenting coconut palm nectar. *Front Microbiol.* 10: 1382.
 23. Tu C., Azi F., Huang J., Xu X., Xing G. and Dong M. 2019. Quality and metagenomic evaluation of a novel functional beverage produced from soy whey using water kefir grains. *LWT.* 113: 108258.
 24. Turek K. and Wszolek M. 2022. Effect of walnut oil on the fatty acid content of probiotic kefir produced either with kefir grains or kefir starter cultures. *Int Dairy J.* 127: 105290.
 25. Wu Q. and Shah N.P. 2015. Gas release-based prescreening combined with reversed-phase HPLC quantitation for efficient selection of high- γ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria. *J Dairy Sci.* 98(2): 790-797.

Microbial and phytochemical attributes of kefir as a functional beverage enriched with red ginseng root extract

Erfan Golmohammadian¹, Marjan Nouri^{1*}

1. Department of Food Science and Technology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

Corresponding author*: Marjan.nouri@iau.ac.ir

Abstract

A number of symbiotic microorganisms including yeasts and lactic acid bacteria constitutes the kefir as a functional beverage. The aim of the current research was to enrich kefir drink by using ginseng extract to produce a functional beverage and improve its health beneficial for human. In the present study, treatments of kefir beverage containing ginseng extract were manufactured at distinct concentrations (0, 0.4, 0.8 and 1.2 %). Physicochemical tests (pH level, acidity rate), phytochemical attributes (antioxidant and total phenolic contents), living microorganism and hydrophobicity index of microbial strains were carried out during shelf life (0, 7, 14 and 21 days). The results of present research demonstrated that pH reduction and acidity enhancement were significantly observed in all beverage treatments during 21 days of shelf life ($p \leq 0.05$). The higher concentration of the extract elevated the antioxidant capacity (70.35 %) and total phenol content (99.60 %). An increase in the survival and activity of lactic acid bacteria (*Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Bifidiobacterium*) was determined by adding ginseng extract, while the opposite trend was detected in long-term shelf life ($p \leq 0.05$). The highest and lowest percentages of hydrophobicity are related to *Lactobacillus* species isolated from the treatment consisting of 0.8 % extract on the 1st day (70.3 %) and *Bifidiobacterium* species isolated from the control on the 21st day (33.5 %). The overall results outlined that the acceptable levels of ginseng extract (0.08 %) can be recommended as a natural preservative and antioxidant in kefir beverage due to its several beneficial effects on human health.

Key words: kefir, functional, probiotic, ginseng, survival

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد میکروبی مخمر غالب جدا شده از خمیر ترش جو

سارا شهریاری^۱، فهیمه حاجی‌نیا^۱، حسین پور عبدالله^۱، مریم ابراهیمی^۲، علیرضا صادقی^{۱*}

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

۲- مرکز تحقیقات سلامت غذا- دارو و ترکیبات طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

مسئول مکاتبات: *Sadeghi.gau@gmail.com

چکیده

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد میکروبی مخمرهای جدا شده از غلات تخمیر شده به منظور تهیه کشت‌های آغازگر، پروبیوتیک و یا سلامتی‌بخش از اهمیت زیادی برخوردار است. لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد میکروبی مخمر غالب جدا شده از خمیر ترش جو به اجرا در آمد. بدین منظور، مخمر دارای بیشترین زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش از بین مخمرهای غالب جدا شده از خمیر ترش جو با استفاده از تکنیک PCR شناسایی گردید. سپس سایر ویژگی‌های پروبیوتیکی و همچنین اثرات ضد میکروبی جدایه مخمیری مذکور مورد بررسی قرار گرفت. توالی‌یابی محصولات PCR منجر به شناسایی *Cyberlindnera fabianii* به عنوان مخمر منتخب شد. همچنین قابلیت زنده‌مانی جدایه مذکور پس از قرارگیری در معرض تیمار متوالی اسید و صفرا در مقایسه با نمونه شاهد ۶۰ درصد بود. علاوه بر این، مخمر مذکور قادر به کاهش ۵ سیکل لگاریتمی از جمعیت باکتری بیماری‌زای *Escherichia coli* بود که نسبت به سایر عوامل غذازاد مورد مطالعه به شکل معنی‌داری ($p < 0/05$) بیشتر بود. جدایه مذکور همچنین توانست رشد *Listeria monocytogenes* و *Salmonella enterica* را تا ۴ سیکل لگاریتمی کاهش دهد اما اثر بازدارنده مشهودی بر *Staphylococcus aureus* نداشت. قابلیت خوداتصال جدایه مذکور نیز معادل ۴۰ درصد تعیین گردید. این جدایه مخمیری نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی نیز مقاوم و در برابر آنتی‌میکوتیک‌های کتوکونازول و فلوکونازول دارای حساسیت نسبی بود. جدایه مذکور، فاقد هرگونه فعالیت همولیتیکی بود و اثر ضد قارچی آن در برابر *Aspergillus niger* نیز مورد تأیید قرار گرفت. بر این اساس، جدایه مخمیری مورد مطالعه از قابلیت مطلوبی جهت استفاده به عنوان کشت پروبیوتیک و محافظت‌کننده در صنایع تخمیری برخوردار می‌باشد.

کلمات کلیدی: مخمر پروبیوتیک، خمیر ترش جو، اثر ضد میکروبی، کشت محافظت‌کننده.

مقدمه

هستند. علاوه بر این، تولید ترکیبات زیست‌فعال گوناگون در انتخاب آنها به عنوان کشت پروبیوتیک تأثیر بسزایی دارد (Ogunremi *et al.*, 2020). این میکروارگانیسم‌ها در تولید فرآورده‌های تجاری نظیر غذاها و نوشیدنی‌ها، ترکیبات غذا-دارویی و همچنین آنزیم‌های صنعتی نیز حائز اهمیت هستند (Moslehi *et al.*, 2010). مخمرهای پروبیوتیک دارای فعالیت بازدارندگی روی میکروارگانیسم‌های عامل فساد و همچنین قادر به تحمل pH پایین و غلظت بالای نمک، تولید آرومای مطلوب و بهبود رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند. همچنین زنده‌مانی آنها طی عبور از دستگاه گوارش با تولید برخی از ویتامین‌ها، ترکیبات آنتی‌اکسیدان و تجزیه ترکیبات ضد تغذیه‌ای مانند فیتات، جلوگیری از رشد عوامل بیماری‌زا، کاهش سطح کلسترول و اتصال به سطح سلول‌های روده‌ای، سبب بهبود سلامت مصرف‌کنندگان می‌شوند (Tadesse *et al.*, 2021). این میکروارگانیسم‌ها به عنوان کشت‌های آغازگر برای تخمیر فرآورده‌های غذایی مختلف نیز مورد استفاده قرار گرفته و سبب بهبود ویژگی‌های حسی محصولات تخمیری می‌شوند. این اثرات ناشی از فعالیت‌های متابولیکی آنزیم‌هایی مانند استرازاها و لیپازها هستند که از مخمرها منشأ می‌گیرند (Bevilacqua *et al.*, 2012; Arroyo López *et al.*, 2012).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به میزان کافی، می‌توانند منجر به بروز اثرات سلامتی‌بخش شوند. امروزه تقاضا برای محصولات غذایی تخمیری حاوی کشت‌های پروبیوتیک رو به افزایش است. اگر چه اغلب، باکتری‌های اسید لاکتیک و بیفیدوباکتری‌ها به‌عنوان عوامل پروبیوتیک در صنایع غذایی انتخاب می‌شوند ولی بررسی فلور میکروبی غلات تخمیر شده و حبوبات، منجر به شناسایی مخمرهایی با خصوصیات عملکردی مناسب شده است. پژوهش‌های بسیاری نیز بر روی قابلیت پروبیوتیکی مخمرها در محصولات تخمیری و نوشیدنی‌ها، پنیر، کفیر، زیتون و شراب انجام شده است. اغلب جنس‌های مخمری در این محصولات نیز به غیر از *Saccharomyces* شامل *Debaryomyces*

Galactomyces Issatchenkia

، *Yarrowia* و *Pichia Kluyveromyces* بوده است. تحمل شرایط نامساعد دستگاه گوارش توسط این میکروارگانیسم‌ها باعث حفظ فلور میکروبی روده در حالت طبیعی، محافظت در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای معده‌ای-روده‌ای و ارتقاء سیستم ایمنی می‌شود (Saarela *et al.*, 2000; Saad *et al.*, 2013).

مخمرها میکروارگانیسم‌های یوکاریوت با اندازه غیر یکنواخت، مقاوم به تنش و دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عموماً غیر بیماری‌زا، غیر سمی و غیر حساسیت‌زا

شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش انسان بود. همچنین میزان خوداتصال آن بین ۱۲ تا ۴۰ درصد گزارش گردید. Palla و همکاران (۲۰۱۹) نیز پس از مطالعه مخمرهای بومی خمیرترش توسکان، ۷۸ مخمر را به صورت تصادفی انتخاب و شناسایی نمودند. محققین مذکور، گزارش کردند که مخمرهای *S. cerevisiae* و *Kazachstania humilis* به ترتیب در این خمیرترش غالب بودند. همچنین پس از تخمیر آرد گندم مشخص شد که هر دو جدایه مذکور دارای فعالیت فیتازی بوده و مخمر *S. cerevisiae* قادر به افزایش حجم خمیر و مخمر *K. humilis* تنها گونه قادر به افزایش غلظت اسیدهای آمینه آزاد بود. بر اساس پژوهش Motey و همکاران (۲۰۲۰) که قابلیت‌های پروبیوتیکی مخمرهای *S. cerevisiae* و *Kluyveromyces marxianus* جدا شده از غلات تخمیر شده آفریقا و برخی از محصولات لبنی را بررسی نمودند، مشخص گردید که تمامی جدایه‌های مخمیری مورد آزمون، قادر به رشد در حضور نمک صفراوی بودند. علاوه بر این، میزان خود اتصالی این جدایه‌ها یک خصوصیت وابسته به نژاد، عنوان گردید که در محدوده ۸/۰۰ تا ۳۶/۲ درصد متغیر بود. بر این اساس، جدایه‌های *S. cerevisiae* و *K. marxianus* از قابلیت‌های پروبیوتیکی مناسب‌تری برخوردار بودند.

Cheliah و همکاران (۲۰۲۱) ضمن ارزیابی قابلیت ضد میکروبی مخمر *Saccharomyces boulardii*

تا کنون گزارش‌هایی در خصوص ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد قارچی مخمرهای جدا شده از غلات و شبه غلات تخمیر شده ارائه گردیده است. به‌عنوان مثال، Mogmenga و همکاران (۲۰۲۳) نیز ۱۴ گونه از مخمر *Saccharomyces*، دو گونه از مخمر *Pichia* و *Rhodotorula mucilaginosa* را پس از بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمرهای جدا شده از نوعی محصول تخمیری سنتی شناسایی کردند. به جز مخمر *R. mucilaginosa*، تمامی این مخمرها قادر به رشد در دمای بدن انسان بودند و بیشترین مقاومت را نسبت به شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش داشتند. علاوه بر این، قابلیت خوداتصالی جدایه‌های مذکور در محدوده ۷۰/۲۰ تا ۹۱/۸۲ درصد متفاوت بود و مخمر *Saccharomyces cerevisiae* از رشد عوامل بیماری‌زای غذازاد ممانعت کرد. همچنین Shahryari و همکاران (۲۰۲۲) ضمن بررسی قابلیت‌های پروبیوتیکی مخمر جدا شده از باکویت تخمیر شده دریافتند که مخمر *Pichia kudriavzevii* جدا شده دارای ۷۹/۲۶ درصد زنده‌مانی بود. علاوه بر این، مخمر مذکور از قابلیت خوداتصالی به میزان ۶۷/۴۰ درصد برخوردار بود. Greppi و همکاران (۲۰۱۷) ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمر *P. kudriavzevii* را مورد آزمون قرار دادند که نتایج این پژوهش حاکی از زنده‌مانی این مخمر در محدوده ۱۱ تا ۴۵ درصد پس از تیمار در

تخمیر تصادفی آرد جو از مخلوط ۱۰۰ گرم آرد و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل با بازده خمیر (نسبت خمیر به آرد $100 \times$) معادل ۲۰۰ در ظروف استریل ۲۴ صورت گرفت. سپس مخلوط مذکور به مدت ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری و اسیدیته قابل تیتراژ آن pH گردید. سپس مقادیر تعیین شد. بدین منظور ۱۰ گرم نمونه با ۹۰ میلی لیتر آب مقطر، رقیق شده و به کمک سود ۰/۱ نرمال تا معادل ۸/۵ تیتراژ گردید که مقدار حجم سود pH مصرفی بیانگر میزان اسیدیته قابل تیتراژ خمیرترش (Back-slopping) بود. همچنین عملیات مایه گیری (که به معنی افزودن مقدار مشخص از خمیرترش روز قبل به خمیرترش جدید است، تا رسیدن به مقادیر Moroni و اسیدیته قابل تیتراژ ثابت ادامه یافت (pH). (به منظور Angelov et al., 2005; et al., 2011). جداسازی مخمرهای غالب خمیرترش جو پس از تکرار فرایند مایه گیری که سبب حفظ جمعیت غالب آن Yeast extract Glucose می شود از محیط کشت و کشت سطحی (Chloramphenicol (YGC) سوسپانسیون خمیرترش پس از رقت سازی متوالی ده دهی بر روی این محیط کشت استفاده شد. پلیت های مذکور نیز به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. پس از رنگ آمیزی کلنی های حاصل، مورفولوژی آنها برای تمایز اولیه مورد بررسی قرار گرفت و برای آزمون های

در یافتند که یک زیرگونه از مخمر *S. boulardii* بیشترین اثر ضد باکتریایی را در برابر ۱۳ عامل بیماری زای مختلف داشت. Sadeghi Ardestani و Kachuei (۲۰۲۲) نیز گزارش نمودند که مخمر پروبیوتیک *S. boulardii* قادر به کاهش عفونت زایی *Candida albicans* بود. هدف از اجرای مطالعه حاضر، بررسی ویژگی های پروبیوتیکی و قابلیت های ضد میکروبی مخمر غالب جدا شده از خمیرترش جو بود.

مواد و روش کار

مواد خام، محیط های کشت میکروبی و مواد شیمیایی

خصوصیات آرد جو مصرفی، مطابق با روش های استاندارد ارزیابی گردید (AACC, 2010). مواد شیمیایی و محیط های کشت مصرفی نیز از شرکت مرک آلمان و کشت های لیوفیلیزه باکتری ها و قارچ های غذازاد شامل *Escherichia coli* PTCC 1399، *Salmonella enterica* PTCC 1709، *Staphylococcus aureus* PTCC 1112، *Listeria monocytogenes* PTCC 1298 و *Aspergillus niger* PTCC 5012 از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهیه و سپس براساس دستورالعمل های مرجع، فعال سازی شدند.

تهیه خمیرترش جو و جداسازی مخمرهای غالب

ال جدا به غالب به کمک کیت تجاری ژن DNA با PCR، کره جنوبی) استخراج و توسط GeneAll (5'-ITS1) استفاده از پرایمرهای عمومی TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' و (ITS4)، (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (باند ۶۵۰ جفت PCR تکثیر شده و سپس محصولات بازی) توسط شرکت پیشگام (ایران) توالی‌یابی گردید. پس از آماده‌سازی مقادیر واکنشگرهای تکثیر و در حجم نهایی ۲۰ PCR چرخه‌های حرارتی، واکنش میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنشگرهای، دانمارک)، ۱/۵ Ampliqon (PCR آماده مصرف ۰/۵ پیکومولار، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت با غلظت تقریبی ۱۰۰ نانوگرم و ۵ DNA میکرولیتر میکرولیتر آب مقطر دیونیزه در دستگاه ترموسایکلر، استرالیا) انجام شد. پس از ژل الکتروفورز (Corbett) در آگارز PCR (۴۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰) محصولات Tris boric acid (TBE) ۱/۵ درصد در بافر EDTA، به منظور شناسایی جدایه مخمری، نتایج Blast با استفاده از رویه PCR توالی‌یابی محصولات NCBI با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی White et al., 1990. هم‌ردیف گردیدند (

مقاومت جدایه مخمری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و

ترکیبات آنتی‌مایکوتیک رایج

بدین منظور، مقاومت جدایه مخمری در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های رایج شامل استرپتومایسین،

دوره ۱۱ شماره ۲ تابستان ۱۴۰۳

بعدی کشت ذخیره مخمرهای جدا شده جهت نگهداری در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس تهیه گردید.

بررسی قابلیت همولیز خون توسط جدایه‌های مخمری غالب

بدین منظور، جدایه‌های مخمری بر روی محیط کشت Blood agar حاوی ۵ درصد خون گوسفند، کشت داده شده و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس، تغییر رنگ و ایجاد هاله در محیط کشت بررسی گردید (Fernández-Pacheco et al., 2021).

ارزیابی زنده‌مانی جدایه‌های مخمری در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش

در این مرحله، ابتدا مخمرهای جدا شده با جمعیت 10^8 CFU/mL تحت شرایط اسیدی در محلول رینگر با $\text{pH} = 2$ و پپسین (3 mg/mL) به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفته و در ادامه، نمک صفراوی با غلظت ۰/۳ درصد و پانکراتین (1 mg/mL) در $\text{pH} = 8$ به آن اضافه گردید و مجدداً به مدت ۲/۵ ساعت در همان دما گرمخانه‌گذاری شد. سپس رقت‌های متوالی هر یک از سوسپانسیون‌های مذکور به صورت سطحی در محیط YGC، کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌ها شمارش شده و نرخ زنده‌مانی نسبت به نمونه شاهد (تیمار نشده) محاسبه گردید (Rolim et al., 2015).

شناسایی مولکولی جدایه غالب مخمری

جهت بررسی قابلیت خود اتصالی جدایه مخمری، مقدار مشخصی از کشت فعال ۲۴ ساعته به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتی‌فیوژ (یونیور سال، ایران) گردید و طی دو مرحله با بافر فسفات استریل، شستشو داده شد. سپس سوسپانسیون مذکور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، گرمخانه‌گذاری و جذب نوری این سوسپانسیون در زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Instruments، انگلیس) خوانش و درصد قابلیت خوداتصالی بر اساس رابطه ذیل محاسبه گردید. در این رابطه A_t مقدار جذب ۲۴ ساعته و A_0 مقدار جذب در ساعت صفر است (Zhang et al., 2011).

$$[1-(A_t/A_0)] \times 100$$

ارزیابی اثر ضد باکتریایی جدایه مخمری

بدین منظور، جدایه مخمری روی *L. S. enterica*، *E. coli monocytogenes* و *aureus* با روش کشت توام بر روی محیط‌های کروموزیک اختصاصی برای هر باکتری (CHROMagar، فرانسه) کشت داده شد. پس از تهیه کشت تازه ۲۴ ساعته از مخمر غالب و تنظیم جمعیت آن، نسبت مشخصی از مخمر (CFU/mL) 10^8 (مذکور با هر یک از باکتری‌های غذازاد با جمعیت یک سان 10^8 CFU/mL)، در محیط کشت Brain heart infusion (BHI) برات مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس رقت‌های

سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، ونکومایسین، سفازولین، سفتریاکسون، سفالوتین، آمپی‌سیلین، ایمی‌پنم و پنی‌سیلین با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (پادتن طب، ایران) ارزیابی گردید. سپس مقاومت این مخمر نسبت به برخی از ترکیبات آنتی‌میکروبییک شامل ایتراکونازول، کتوکونازول، فلوکونازول و برخی نگهدارنده‌ها از جمله ناتامایسین، سوربات پتاسیم و پروپیونات کلسیم (Merck، آلمان) نیز بررسی شد. بدین منظور، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته جدایه مخمری (CFU/mL) 10^8 به ۴ میلی‌لیتر محیط کشت YGC یک درصد آگار (دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد) افزوده و سپس بر روی پلیت‌های حاوی محیط YGC agar ۱/۵ درصد منتقل شد. در ادامه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تجاری بر روی سطح این پلیت‌ها قرار گرفته و پلیت‌های مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در پایان، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد و نتیجه آزمایش به صورت مقاوم (قطر کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر)، حساسیت نسبی (قطر ۱۵ تا ۱۹ میلی‌متر) و حساس (قطر بیشتر از ۲۰ میلی‌متر) گزارش گردید (Rojo-Bezares et al., 2006; Fekri et al., 2020).

بررسی قابلیت خود اتصالی جدایه مخمری غالب

تمامی آزمون‌ها در سه تکرار، انجام شده و نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) با مقایسات زوجی حداقل اختلاف معنی‌داری (Least significant difference) LSD در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل گردید. برای آنالیز آماری و ترسیم نمودارها نیز به ترتیب، نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۰ و Excel نسخه ۲۰۱۶ مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج

خصوصیات آرد و جداسازی مخمر

آرد جو مورد استفاده در این پژوهش، حاوی ۱۲/۷ درصد رطوبت، ۲/۶ درصد ساکارز، ۰/۲۵ درصد خاکستر و pH آن معادل ۳/۶ بود. پس از ماه‌گیری متوالی خمیرترش جو، میزان pH معادل با 0.00 ± 4.19 و اسیدیته قابل تیتراژ در روز دهم با رسیدن به ثبات، معادل 0.49 ± 24.45 بود. همچنین بر اساس مشاهدات مورفولوژی، ۵ مخمر متفاوت جداسازی شد که جدایه منتخب به صورت کلنی‌های بیضوی تا کشیده بود.

قابلیت همولیز خون توسط جدایه‌های مخمری

فعالیت همولیزی جدایه‌های مخمری در پژوهش حاضر از نوع گاما (فاقد فعالیت همولیزی) بود.

غربالگری مخمرهای جدا شده

میزان زنده‌مانی ۵ سویه مخمری جدا شده از خمیرترش جو در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش در بازه ۰ تا ۶۰ درصد متغیر بود (شکل ۱). زنده‌مانی مخمر منتخب

متوالی از این سویه‌ها در محیط کشت کروموژنیک، کشت سطحی داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. در انتها، تعداد کلنی‌ها شمارش و با تعداد کلنی‌های نمونه شاهد که فقط حاوی باکتری بیماری‌زا بود، مقایسه گردید (Zarali et al., 2023).

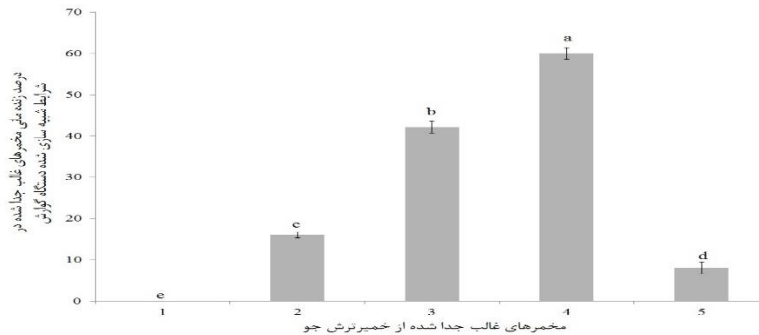
ارزیابی اثر ضد قارچی جدایه مخمری

بدین منظور از روش کشت دو لایه استفاده شد. جدایه مخمری در محیط YGC agar با روش اسپات (لکه‌گذاری) کشت داده شد و در ادامه، سویه‌های اسپور قارچ غذازاد *A. niger* با جمعیت 10^5 اسپور در هر میلی‌لیتر به صورت لایه دوم به همراه PDA (Potato Dextrose Agar) بر روی آنها ریخته شده و پس از انعقاد لایه دوم، پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز گرمخانه‌گذاری شدند. سپس درصد بازدارندگی از رشد قارچ به کمک نرم‌افزار *Image J* (نسخه 1.42e) تعیین شد. برای محاسبه درصد بازدارندگی از رشد قارچ، سطح رشد قارچ در پلیت کنترل (نمونه شاهد)، معادل صد درصد در نظر گرفته شد و سپس درصد رشد قارچ در پلیت حاوی مخمر در مقایسه با آن تعیین گردید. در انتها تفاوت مقادیر مذکور به عنوان درصد بازدارندگی گزارش گردید (Magnusson et al., 2003).

آنالیز آماری نتایج

شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش در مقایسه با سایر مخمرهای جدا شده برخوردار بود.

جدا شده از این بستره تخمیری (جدایه شماره ۴) نیز معادل $1/14 \pm 60/00$ درصد تعیین گردید که به شکل معنی‌داری ($P < 0/05$) از بیشترین میزان زنده مانی در

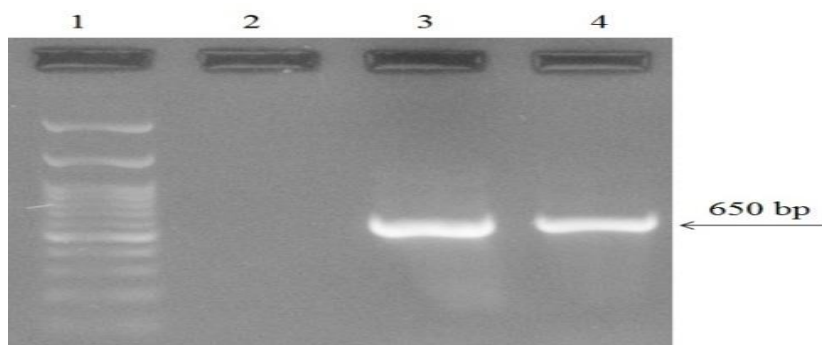


شکل ۱- درصد زنده مانی مخمرهای غالب جدا شده از خمیرترش جو در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش. حروف متفاوت، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0/05$ هستند.

سرانجام بر اساس نتایج توالی‌یابی محصولات PCR و همردیفی آن‌ها با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI جدایه مخمری، *Cyberlindnera fabianii* (۹۹ درصد همپوشانی) شناسایی گردید.

شناسایی مولکولی جدایه مخمری منتخب

ژل الکتروفورز محصولات PCR منجر به تأیید تکثیر اختصاصی توالی هدف ۶۵۰ جفت‌بازی جدایه مخمری در مقایسه با نمونه کنترل منفی و کنترل مثبت شد (شکل ۲).



شکل ۲- ژل الکتروفورز محصولات PCR جهت شناسایی جدایه مخمری غالب. لاین ۱: لدر ۱۰۰ جفت بازی، لاین ۲: نمونه کنترل منفی، لاین ۳: نمونه کنترل مثبت، لاین ۴: محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن *ITS* با طول ۶۵۰ جفت باز از DNA مخمر منتخب جدا شده از خمیرترش جو.

جدایه مخمری منتخب در برابر تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه، مقاوم بود. نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه مخمری نیز در جدول ۱ آمده است. بر این اساس،

مقاومت جدایه مخمری منتخب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌مایکوتیک‌های رایج

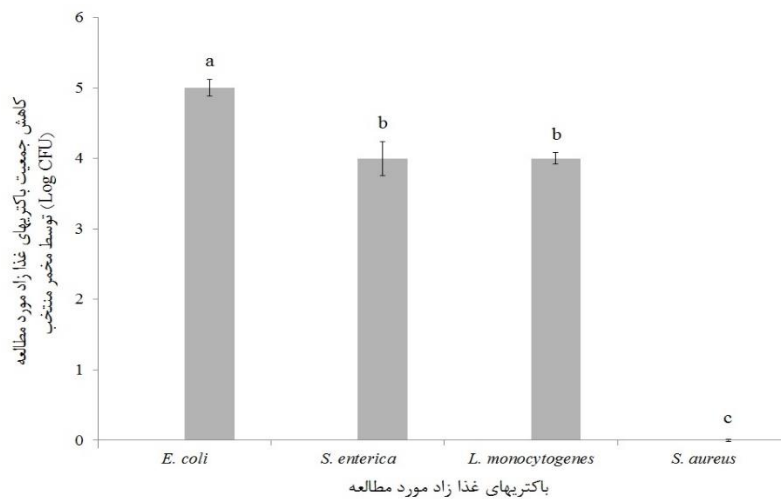
جدایه مذکور در برابر آنتی‌میکروبیوتیک‌های رایج مانند ایتراکونازول و ناتامایسین، سوربات پتاسیم و پروپیونات کتوکونازول و فلوکونازول، نیمه‌حساس و در برابر کلسیم، مقاوم بود.

جدول ۱- مقاومت جدایه مخمری در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک و آنتی‌میکروبیوتیک‌های رایج بر اساس آزمون انتشار در دیسک

آنتی‌بیوتیک و آنتی‌میکروبیوتیک (میکروگرم)	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	مقاومت نسبی
پنی‌سیلین (۱۰)	$0/00 \pm 0/00$	مقاوم
سفازولین (۳۰)	$0/00 \pm 0/00$	مقاوم
سفالوتین (۳۰)	$0/00 \pm 0/00$	مقاوم
سفتریاکسون (۳۰)	$0/00 \pm 0/00$	مقاوم
ایمی‌پنم (۱۰)	$0/00 \pm 0/00$	مقاوم
استرپتومایسین (۱۰)	$0/00 \pm 0/00$	مقاوم
اسید نالیدیکسیک (۳۰)	$0/00 \pm 0/00$	مقاوم
جنتامایسین (۱۰)	$0/00 \pm 0/00$	مقاوم
ونکومایسین (۳۰)	$0/00 \pm 0/00$	مقاوم
ایتراکونازول (۱۰)	$0/28 \pm 0/80$	مقاوم
فلوکونازول (۱۵)	$2/53 \pm 17/00$	حساسیت نسبی
کتوکونازول (۲۰)	$6/18 \pm 14/57$	حساسیت نسبی
سوربات پتاسیم (۶۰)	$0/00 \pm 0/00$	مقاوم
پروپیونات کلسیم (۶۰)	$0/00 \pm 0/00$	مقاوم
ناتامایسین (۳۰)	$0/91 \pm 8/75$	مقاوم

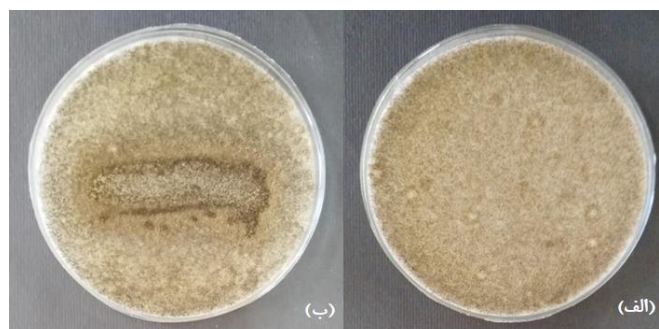
حروف متفاوت، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0/05$ هستند.

بیماری‌زای *S. enterica* و *L. monocytogenes* را نیز تا ۴ سیکل لگاریتمی کاهش دهد در صورتی که تأثیر معنی‌داری بر باکتری *S. aureus* نداشت (شکل ۳). بر این اساس، بازدارندگی مخمر منتخب روی *E. coli* به شکل معنی‌داری ($P < 0.05$) از سایر باکتری‌های مورد مطالعه بیشتر بود.



شکل ۳- اثر بازدارنده مخمر منتخب جدا شده از خمیر ترش جو روی برخی از باکتری‌های غذازاد. حروف متفاوت، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ هستند. بازدارندگی از رشد این قارچ در مقایسه با نمونه شاهد $28/67 \pm 0/77$ درصد بود.

اثر ضد قارچی جدایه مخمری روی *A. niger* بر اساس نتایج آزمون کشت دو لایه (شکل ۴) نشان داد که میزان



شکل ۴- اثر ضد قارچی جدایه مخمری پس از پنج روز گرمخانه‌گذاری در آزمون کشت دو لایه روی *A. niger* (ب) در مقایسه با نمونه شاهد (الف).

بحث

۹۵/۷۷ درصد بود. در ادامه، مقاومت مخمرها نسبت به آنزیم پپسین، نمک‌های صفاوی و پانکراتین نیز مورد آزمون قرار گرفت که تمامی مخمرهای مورد آزمون ۱۴/۴۵-۸۷/۸۹ درصد زنده‌مانی داشتند. مقاومت عوامل پروبیوتیک در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش به دلیل مصرف خوراکی آنها، حائز اهمیت می‌باشد. بنابر این، مقاومت به شرایط اسیدی معده یکی از عوامل اساسی در انتخاب پروبیوتیک‌ها می‌باشد. Cheliah و همکاران (۲۰۲۱) به منظور ارزیابی قابلیت زنده‌مانی ۶ زیرگونه از مخمر *S. boulardii* در pH=1 گزارش نمودند که هیچ‌گونه زنده‌مانی مشاهده نشد. درحالی‌که در pH=2 تا pH=7 تمامی مخمرها زنده باقی ماندند. به دلیل مقاومت مناسب سویه‌های مخمری نسبت به pH دستگاه گوارش از آنها در تولید داروها استفاده می‌شود. علاوه بر این، در شرایطی که هدف، تولید محصول غذایی خاصی با pH های قلیایی یا اسیدی باشد نیز می‌توان از جدایه‌های مخمری استفاده نمود. بیان ژن‌های مربوط به سنتز پروتئین‌ها و پاسخ به تنش می‌تواند موجب زنده‌مانی بیشتر مخمر *S. boulardii* در pH اسیدی شوند. از جمله آنزیم‌های اساسی میکروبی مؤثر در زنده‌مانی مناسب مخمرهای پروبیوتیک می‌توان به هیدرولاز نمک صفاوی و اسید دهیدراتاز صفاوی اشاره نمود که با فعالیت خود سبب هیدرولیز نمک صفاوی و در ادامه باعث کاهش اثرات بازدارنده نمک صفاوی می‌گردند.

بر اساس نتایج حاصل از توالی‌یابی، *C. fabianii* به عنوان مخمر منتخب خمیرترش جو شناسایی شد. Johansson و همکاران (۲۰۲۱) نیز با هدف جداسازی مخمر از خمیرترش‌های مختلف، ۵۶ مخمر از ۱۰ گونه را شناسایی نمودند. در پژوهش مذکور، مخمر *C. fabianii* از خمیرترش چاودار جداسازی شد. جدایه‌های غالب خمیرترش معمولاً به واسطه رقابت‌پذیری و تطابق‌پذیری بالا در شرایط تنش‌زای موجود در این اکوسیستم تخمیری از قابلیت‌های پروبیوتیکی و ضد میکروبی مناسبی برخوردار هستند (Sadeghi et al., 2023).

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون زنده‌مانی، میزان زنده‌مانی جدایه مخمری منتخب معادل با $1/14 \pm$ ۶۰/۰۰ درصد ارزیابی گردید که بالاترین میزان زنده‌مانی را در مقایسه با سایر مخمرهای جدا شده داشت. تا کنون، مطالعاتی در رابطه با بررسی میزان زنده‌مانی مخمرهای عمده جدا شده از غلات و شبه غلات تخمیر شده در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش صورت گرفته است. به عنوان مثال، Gebre و همکاران (۲۰۲۳) ضمن بررسی میزان زنده‌مانی مخمرهای موجود در نوعی بستره تخمیری با نام بورده (Borde) گزارش کردند که ۱۳ جدایه مخمری از مقاومت بالایی در شرایط اسیدی معده برخوردار بودند. بیشترین زنده‌مانی در شرایط اسیدی مربوط به مخمر AM18 با

مطابق با نتایج حاصل از تعیین اثر ضد میکروبی، جدایه مخمیری منتخب موجب کاهش ۵ سیکل لگاریتمی از جمعیت باکتری *E. coli* نسبت به نمونه شاهد گردید. همچنین جدایه مذکور، قادر به کاهش جمعیت باکتری‌های بیماری‌زای *S. enterica* و *L. monocytogenes* تا ۴ سیکل لگاریتمی نیز بود در صورتی که تأثیر معنی‌داری بر باکتری *S. aureus* نداشت. فعالیت ضد میکروبی ناشی از تولید پپتیدها و اسیدهای آلی در مخمرها نقش کلیدی در خصوصیات پروبیوتیکی آن‌ها دارد. اثر بازدارندگی بر باکتری‌ها توسط مخمرها بستگی به رقابت بر سر مواد مغذی، تولید اتانول و اسیدهای آلی و یا آزاد شدن محتوای ضد میکروبی مانند مایکوسین‌ها دارد (Sadeghi et al., 2022). Alkay و همکاران (۲۰۲۱) ضمن بررسی اثر ضد میکروبی مخمرهای جدا شده از نوعی بسته‌ری تخمیری گزارش نمودند که هیچ کدام از مخمرها فعالیت مهارکنندگی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا نداشتند. بر این اساس، اثر پروبیوتیکی مخمرها علیه عوامل بیماری‌زا ممکن است با مکانیسم‌های مربوط به حذف فیزیکی باکتری‌های بیماری‌زا مرتبط باشد. علاوه بر این، Cheliah و همکاران (۲۰۲۱) گزارش نمودند که *S. boulardii* نسبت به ۹ عامل بیماری‌زای *Enterococcus faecalis*، *Shigella dysenteriae*، *Salmonella typhi*، *Vibrio cholerae*، *Shigella flexneri* حساس بوده در حالی که رومانند فاقد سلول این مخمر حساسیت کمتری

علاوه بر این، برخی از پروبیوتیک‌ها به واسطه خنثی‌سازی اسید موجب کاهش pH می‌شوند و بدین طریق با شرایط اسیدی معده مقابله می‌کنند (Montville and Matthews, 2012). همچنین Ogunremi و همکاران (۲۰۱۵) دریافتند که مخمر *P. kudriavzevii* زنده‌مانی مناسبی در نوعی مخلوط غلات تخمیری داشت و pH را از ۶/۰۱ به ۵/۰۸ کاهش داد. دلایل گوناگونی در رابطه با زنده‌مانی مخمرهای پروبیوتیک در محصولات غذایی عملگرا بر پایه غلات وجود دارد. به عنوان مثال، پایداری در طول تغییرات فرآیند تولید ماده غذایی از جمله غلظت‌های مختلف نمک، فعالیت اکسیژن و pH که در ادامه می‌تواند اثرات مثبتی بر خصوصیات حسی محصول نیز داشته باشد. هیچ‌یک از جدایه‌های مخمیری در پژوهش حاضر فعالیت همولیتیک نداشتند. بر اساس استانداردهای FAO و WHO نیز یکی از اصول اساسی برای ارزیابی قابلیت‌های پروبیوتیکی، عدم همولیز خون و ایمنی جدایه-هاست (Gebre et al., 2023). Fernández-Pacheco و همکاران (۲۰۲۱) گزارش نمودند که هیچ کدام از ۲۰ مخمر مورد آزمون، دارای فعالیت همولیتیکی در محیط خون‌دار پس از ۴۸ ساعت نبودند. در مخمرها فاکتور همولیتیک به‌عنوان یک عامل حدت احتمالی شناخته شده است که سبب بیماری‌زایی در گونه *Candida* می‌شود.

ضمن ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۶ مخمر مورد بررسی در برابر ۳۰ آنتی‌بیوتیک رایج دریافتند که هر کدام از مخمرها ضمن داشتن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمون از نحوه عمل متفاوتی برخوردار بودند. از جمله مکانیسم‌های مؤثر در مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توان به بازدارندگی سنتز دیواره سلولی، پروتئین و اسید نوکلئیک اشاره کرد. Fernández-Pacheco و همکاران (۲۰۲۱) نیز پس از بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مخمرهای جدا شده از نوعی بسته تخمیری در مقابل چند آنتی‌بیوتیک رایج دریافتند که مخمرهای مذکور، نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند در حالی که جنس‌های غیر *Saccharomyces* در برابر عوامل آنتی‌مایکوتیکی، نیستاتین و سیکلوپیروکس اولامین بیشترین مقاومت و کوچکترین هاله بازدارندگی را داشته اما سویه‌های *Saccharomyces* بیشترین مقاومت را نسبت به فلوکونازول و کلوتریمازول داشتند. Goktas و همکاران (۲۰۲۱) گزارش نمودند که میزان حساسیت مخمرها نسبت به عوامل ضد قارچی متفاوت می‌باشد و مخمرهای جدا شده توسط پژوهشگران مذکور، بیشترین حساسیت را نسبت به فلوکونازول و کتوکونازول داشتند. همچنین از بین مخمرهای جدا شده در پژوهش مذکور، بیشترین مقاومت دارویی نسبت به آمفوتریسین B وجود داشت. از جمله مکانیسم‌های مخمرها برای مقاومت در برابر

نسبت به تمامی عوامل بیماری‌زا داشت. *S. boulardii* با دو مکانیسم اصلی تولید عواملی که خنثی‌کننده سموم باکتریایی هستند و تحریک مسیرهای مرتبط با کوئوروم سنسینگ سلول میزبان در پاسخ‌های پیش‌التهابی در طول عفونت‌های باکتریایی عمل می‌کند. همچنین Alkalbani و همکاران (۲۰۲۲) گزارش نمودند که مخمر *P. kudriavzevii* با تولید نوعی توکسین کشنده از رشد عوامل بیماری‌زا جلوگیری می‌کند. در مطالعه مذکور جنس‌های مختلف مخمری، سطوح بازدارندگی متفاوتی در برابر *S. E. coli*، *Salmonella typhimurium* و *L. monocytogenes aureus* داشتند.

مطالعات صورت گرفته در رابطه با میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی و آنتی‌مایکوتیکی جدا یه‌های مخمری حاکی از مقاومت کامل آنها در مقابل هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌ها و سطوح متفاوت حساسیت در برابر عوامل آنتی‌مایکوتیک است. براساس پژوهش Gebre و همکاران (۲۰۲۳) جدا یه‌های مخمری مورد آزمون نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های رایج، مقاوم بودند. بنابر این، می‌توانند درمان‌های آنتی‌بیوتیکی طی بیماری را تحمل کنند. همچنین استفاده از مخمرها در درمان‌های آنتی‌بیوتیکی، ایمن تلقی می‌شود زیرا آنها توانایی انتقال مواد ژنتیکی بین مخمرها و باکتری‌ها را ندارند. بنابر این، هنگام انتخاب یک پروبیوتیک، حساسیت آن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها یک عامل کلیدی است. Cheliah و همکاران (۲۰۲۱) نیز

مختلف، تغییرات مشخصی دارد که به دلیل خوشه‌ای شدن و اتصال سلول‌ها از طریق برهمکنش‌های سلول به سلول می‌باشد. همچنین Cheliah و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که یک زیرگونه از مخمر *S. boulardii* با کد KT000032 بیشترین میزان خوداتصال تا ۹۳/۱۴ درصد را پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری داشت. علاوه بر این، قابلیت خود اتصالی تمامی ۱۲ سویه مخمری در پژوهش Alkalbani و همکاران (۲۰۲۲) نیز پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد از ۵۰/۷۰ تا ۸۵/۸۰ درصد گزارش شد. قابلیت اتصال در پروبیوتیک‌ها به دو صورت خود اتصالی (اتصال سویه‌های میکروارگانیزم‌های هم نوع) و دگر اتصالی (اتصال میکروارگانیزم‌های متفاوت) مورد بررسی قرار می‌گیرد. به طور کلی، اتصال پروبیوتیک‌های هم نوع، سبب مسدود شدن جایگاه اتصال عوامل بیماری‌زا شده و عموماً موجب بهبود اتصال آنها به سلول‌های اپی‌تلیال روده، لانه‌گزینی و محافظت از دستگاه گوارش می‌شود (Janković *et al.*, 2012; Sadeghi *et al.*, 2022). خوداتصالی در مخمرها به دنبال کاهش کربوهیدرات‌ها در طی فاز سکون یا تأخیر رشد آنها رخ می‌دهد. اندازه سلول‌های مخمری از باکتری‌ها بزرگ‌تر و سنگین‌تر بوده و بنابر این، نقش پررنگ‌تری در لانه‌گزینی دارند. اگرچه این خصوصیت کاملاً وابسته به جنس، گونه و نژاد آنها بوده و به برخی عوامل مانند خصوصیات فیزیکیوشیمیایی و

آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان به تغییر یا اصلاح نفوذپذیری غشاء سلول، بازدارندگی سنتز پروتئین‌های میتوکندریایی، جهش و کاهش فعالیت‌های تجزیه ATP اشاره کرد. مقاومت در برابر آنتی‌میکوتیک‌ها نیز ممکن است ناشی از ممانعت از سنتز استرول‌ها و صدمات مستقیم غشایی، بازدارندگی سنتز RNA و DNA سلولی، فعالیت پمپ افلاکس (سیستم انتشار یون‌ها و یا نحوه انتقال آنها)، تغییر جایگاه هدف ترکیب آنتی‌میکوتیک، تحریک سیستم پمپ پروتونی در غشاء سلول و یا تداخل در فرایند بیان ژن باشد (Kanafani and Perfect, 2014; Goretti *et al.*, 2009).

نتایج به دست آمده از آزمون خوداتصالی نیز بیانگر قابلیت خوداتصالی $1/41 \pm 40/00$ درصد جدایه مخمری منتخب بود. قابلیت خوداتصالی در مخمرها نیز توسط محققین مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان مثال، Gebre و همکاران (۲۰۲۳) گزارش نمودند که پدیده خوداتصالی جدایه‌های مخمری به دلیل برهمکنش و تعامل آنها با ترکیبات مختلف سطح سلول‌های روده مانند پروتئین‌ها می‌باشد که از طریق ارزیابی قابلیت خوداتصالی تعیین می‌گردد. نتایج این پژوهشگران بیانگر میزان ۶۹/۳۶ تا ۸۹/۳۹ درصد خوداتصالی برای جدایه‌های مخمری مورد آزمون پس از ۲۴ ساعت بود. ویژگی خوداتصالی کاملاً وابسته به طول زمان گرمخانه‌گذاری می‌باشد و در طول زمان‌های

۴/۰۳ از *P. roqueforti* و *Penicillium rubens* تا ۷۷/۰۳ درصد گزارش شد. بر اساس نتایج پژوهش Fakruddin و همکاران (۲۰۱۷) مشخص گردید که مخمر *S. cerevisiae* فعالیت ضد قارچی مناسبی در برابر *A. niger* *Aspergillus astus* و *Pichia cryzogenum* *Aspergillus ocrasus* و *Rhizzopus oryzae* داشت که بیشترین اثر بازدارنده آن بر روی *A. niger* و کمترین اثر بر *A. astus* مشاهده شد. از جمله ساز و کارهای دخیل در قابلیت ضد قارچی مخمرها می‌توان به تولید متابولیت‌هایی مانند دی‌اکسید کربن، اتانول، ترکیبات پروتئینی یا پپتیدهای با وزن مولکولی پایین اشاره نمود (Ruggirello et al., 2019; Kapetanakou et al., 2012).

نتیجه‌گیری

بررسی فلور میکروبی غلات و شبه‌غلات تخمیر شده به دلیل وجود نژادهای مخمری با قابلیت‌های مطلوب، همواره جالب توجه بوده است. لذا جداسازی فلور میکروبی جدید از چنین زیست‌بوم‌هایی توجه محققین را به خود معطوف نموده است. در مطالعه حاضر، مخمر *C. fabianii* با میزان زنده مانی مطلوب در تیمار شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش، عدم همولیز خون و قابلیت خوداتصال مناسب انتخاب گردید. مخمر مذکور، اثر ضد باکتریایی قابل توجهی در برابر سه عامل بیماری‌زای غذازاد داشته و از فعالیت ضد قارچی مناسبی در برابر *A. niger* نیز برخوردار بود.

درشت‌مولکول‌های سطح سلول، ترکیبات مختلف دیواره سلولی، حضور Ca^{2+} و مانوز در محیط نیز بستگی دارد (Gil-Rodriguez et al., 2015).

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، اثر بازدارنده جدایه مخمری بر *A. niger* مورد تأیید قرار گرفت. بر اساس پژوهش‌های موجود، مخمر *S. boulardii* کاهنده تجمع قارچی مانند *C. albicans* در دستگاه گوارش محسوب می‌شود. مخمر پروبیوتیک *S. boulardii* از عفونت‌های حاصل از *C. albicans* در کبد، کلیه، خون و سلول‌های لنفاوی جلوگیری می‌کند. امروزه، داروهای ضد قارچی شامل نیستاتین، آمفوتریسین B، فلوکونازول، ایتراکونازول و وریکونازول به شکل مرسوم جهت درمان کاندیدازیس استفاده می‌شوند. با این وجود، اثرات نامطلوب این داروها و ظهور نژادهای مقاوم به دارو، نیاز به توسعه درمان‌های جایگزین را برجسته‌تر می‌کند. در این رابطه، استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد درمانی جایگزین مطلوب در نظر گرفته شود (Sadeghi, Ardestani and Kachuei, 2022). همکاران (۲۰۲۱) ضمن ارزیابی اثر ضد قارچی مخمرهای جدا شده از یک بسته تخمیری در برابر *Aspergillus* *Penicillium expansum* *A. niger* *flavus* *Penicillium* و *Penicillium carneum* مشخص نمودند که مخمرها اثرات ضد قارچی گوناگونی در برابر کپک‌های مختلف دارند. به طوری که بیشترین و کمترین اثر ضد قارچی در برابر

نتایج، می‌توان از مخمر مذکور به عنوان کشت پروبیوتیک و یا محافظت کننده در صنایع غذایی نیز استفاده نمود.

با تأیید ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمرها امکان استفاده از آنها در تولید محصولات تخمیری غذایی و غیر غذایی سلامتی‌بخش فراهم می‌گردد. بر اساس این

منابع

- AACC International. 2010. Approved methods of the American association of cereal chemists. 11th Ed. The St. Paul.
- Alkalbani N. S., Osaili T. M., Al-Nabulsi A. A., ObaidFakruddin M. D., Nur Hossain M. D., Ahmed M. M. R. S., Olaimat A. N., Liu S. Q., Ayyash M. M. 2022. *In vitro* characterization and identification of potential probiotic yeasts isolated from fermented dairy and non-dairy food products. J Fungi. 8(5): 544.
- Alkay Z., Dertli E., Durak M. Z. 2021. Investigation of probiotic potential of yeasts isolated from sourdoughs from different regions of Turkey. Acta Aliment. 50(4): 610-619.
- Angelov A., Gotcheva V., Hristozova T., Gargova S. 2005. Application of pure and mixed probiotic lactic acid bacteria and yeast cultures for oat fermentation. J Sci Food Agr. 85(12): 2134-2141.
- Arroyo López F. N., Romero Gil V., Bautista Gallego J., Rodriguez Gomez F., Jimenez Diaz R., García García P., Garrido Fernandez A. 2012. Potential benefits of the application of yeast starters in table olive processing. Front Microbiol. 3: 161.
- Bevilacqua A., Corbo M. R., Sinigaglia M. 2012. Selection of yeasts as starter cultures for table olives: a step-by-step procedure. Front Microbiol. 3: 1-9.
- Chelliah R., Kim E. J., Daliri E. B. M., Antony U., OhGil-Rodriguez A. M., Carrascosa A. V., Requena T. D. H. 2021. *In vitro* probiotic evaluation of *Saccharomyces boulardii* with antimicrobial spectrum in a *Caenorhabditis elegans* model. Foods. 10(6): 1428.
2017. Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic, BMC Complement Altern Med. 17(1): 1-11.
- Fekri A., Torbati M. A., Yari Khosrowshahi A., Bagherpour Shamlood H., Azadmard-Damirchi S. 2020. Functional effects of phytate-degrading, probiotic lactic acid bacteria and yeast strains isolated from Iranian traditional sourdough on the technological and nutritional properties of whole wheat bread. Food Chem. 306: 125620.
- Fernández-Pacheco P., Ramos Monge I. M., Fernández-González M., Poveda Colado J. M., Arévalo Villena M. 2021. Safety evaluation of yeasts with probiotic potential. Frontiers Nutr. 8: 659328.
- Gebre T. S., Emire S. A., Chelliah R., Aloo S. O., Oh D. H. 2023. Isolation, functional activity, and safety of probiotics from Ethiopian traditional cereal-based fermented beverage, "Borde". LWT-Food Sci Technol. 184:115076.
2015. Yeasts in foods and beverages: *In vitro*

- characterisation of probiotic traits. *LWT-Food Sci Technol.* 64(2): 1156-1162.
- Goktas H., Dikmen H., Demirbas F., Sagdic O., DertliMagnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J., Schnürer E. 2021. Characterisation of probiotic properties of yeast strains isolated from kefir samples. *Int J Dairy Technol.* 74(4): 715-722.
- Goretti M., Turchetti B., Buratta M., Branda E., Corazzi I., Vaughan-Martini A., Buzzini P. 2009. *In vitro* Mogmenga I., Somda M. K., Ouattara C. A. T., Keita I., antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. *Int J Food Microbiol.* 131(2-3): 178-182.
- Greppi A., Saubade F., Botta C., Humblot C., Guyot J.P., Cocolin L. 2017. Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance Montville T. J., Matthews K. R. 2012. Physiology, folate content of traditional cereal-based growth, and inhibition of microbes in African fermented food. *Food Microbiol.* 62: 169-177.
- Janković T., Frece J., Abram M., Gobin I. 2012. Moroni A., Arendt E., Dal Bello F. 2011. Biodiversity Aggregation ability of potential probiotic of lactic acid bacteria and yeast in *Lactobacillus plantarum* strains. *Int J Sanitary Eng Res.* 6(1): 19-24.
- Johansson L., Nikulin J., Juvonen R., Krogerus K., Moslehi Jenabian S., Lindegaard L., Jespersen L. 2010. Beneficial effects of probiotic and food borne Magalhães F., Mikkelsen A., ... Gibson, B. 2021. Sourdough cultures as reservoirs of yeasts on human health. *Nutrient.* 2(4): 449-473.
- Kanafani Z. A., Perfect j. R. 2014. Resistance to maltose-negative yeasts for low-alcohol beer Motey G. A., Johansen P. G., Owusu-Kwarteng J., Ofori L. A., Obiri-Danso K., Siegumfeldt H., ... Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clini Infect Dis.* 46(1): 120-128.
- Kapetanakou A. E., Kollias J. N., Drosinos E. H., Skandamis P. N. 2012. Inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of Jespersen L. 2020. Probiotic potential of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* isolated from West African spontaneously fermented cereal and milk products. *Yeast.* 37(9-10): 403-412.
- ochratoxin A by bacteria and yeast composites Ogunremi O. R., Agrawal R., Sanni A. 2020. Production and characterization of volatile compounds and phytase from potentially probiotic yeasts and beverages. *Int J Food Microbiol.* 152(3): 91-99.

- isolated from traditional fermented cereal foods Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Mättö J., Mattila-
in Nigeria. J Genet Eng Biotechnol. 18: 1-8.
- Ogunremi O. R., Sanni A. I., Agrawal, R. 2015. Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal based Nigerian traditional fermented food products. J Appl Microbiol. 119(3): 97-808.
- Palla M., Agnolucci M., Calzone A., Giovannetti M., Di Cagno R., Gobbetti M., Rizzello C. G., Pontonio E. 2019. Exploitation of autochthonous Tuscan sourdough yeasts as potential starters. Int J Food Microbiol. 302: 59-68.
- 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. Int J Food Microbiol. 111(3): 234-240.
- Rolim F. R. L., dos Santos K. M. O., de Barcelos S. C., do Egito A. S., Ribeiro T. S., da Conceição M. L. 2015. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. LWT-Food Sci Technol. 63(2): 807-813.
- Ruggirello M., Nucera D., Cannoni M., Peraino A., Rosso F., Fontana M., Cocolin L., Dolc P. 2019. Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. Food Res Int. 115: 519-525.
- Saad N., Delattre C., Urdaci M., Schmitter J. M., White T. J., Bruns T., Lee S. J. W. T., Taylor J. 1990. Bressollier P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. LWT-Food Sci Technol. 50(1): 1-16.
- Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J Biotechnol. 84(3):197-215.
- Sadeghi A., Ebrahimi M., Hajinia F., Kharazmi M. S., Jafari S. M. 2023. FoodOmics as a promising strategy to study the effects of sourdough on human health and nutrition, as well as product quality and safety; Back to the future. Trends Food Sci Tech. 136(11): 24-47.
- Sadeghi A., Ebrahimi M., Shahryari S., Kharazmi M. S., Jafari S. M. 2022. Food applications of probiotic yeasts; focusing on their techno-functional, postbiotic and protective capabilities. Trends Food Sci Tech. 128: 278-295.
- Sadeghi Ardestani Z., Kachuei R. 2022. Assessment of antifungal activity of *Saccharomyces boulardii* against *Candida albicans* biofilm. Infect Epidemiol Microbiol. 8(3): 243-249.
- Shahryari S., Sadeghi A., Ebrahimi M., Sadeghi Mahoonak A., Moayedi A. 2022. Evaluation of probiotic and antifungal properties of the yeast isolated from buckwheat sourdough. Iranian Food Sci Technol Res J. 18(5): 575-588.
- Abera S., ... Abena T. 2021. Evaluating the probiotic potential of yeasts isolated from Ethiopian traditionally fermented foods and dairy products. Int J Sci Res Updat. 1(1):1-10.
- Amplification and direct sequencing of fungal Ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. 18(1): 315-322.

-
- Zarali M., Sadeghi A., Jafari S. M., Ebrahimi M., Mahoonak A. S. 2023. Enhanced viability and improved *in situ* antibacterial activity of the probiotic LAB microencapsulated layer-by-layer in alginate beads coated with nisin. Food Bioscience. 53: 102593.
- Zhang Y., Zhang L., Du M., Yi H., Guo C., Tuo Y. 2011. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild *Lactobacilli* from fermented food. Microbiol Res. 167(1): 27-31.

Evaluation of probiotic and antimicrobial properties of the predominant yeast isolated from barley sourdough

Shahryari, S.¹, Hajinia, F.¹, Purabdollah, H.¹, Ebrahimi, M.², Sadeghi, A.^{1*}

1. Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2. Food, Drug & Natural Products Health Research Center, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran

*Corresponding author: Sadeghi.gau@gmail.com

Abstract

It is very important to evaluate the probiotic and antimicrobial properties of yeasts isolated from fermented cereals in order to prepare starter, probiotic or functional cultures. Therefore, the present study was conducted with the aim of investigating the probiotic and antimicrobial properties of the predominant yeast isolated from barley sourdough. For this purpose, the yeast with the highest survival in the simulated conditions of the gastrointestinal tract among the predominant yeasts isolated from barley sourdough was identified using PCR technique. Then, other probiotic properties and antimicrobial effects of the selected yeast isolate were investigated. Sequencing results of the PCR products led to the identification of *Cyberlindnera fabianii* as the selected yeast isolate. Furthermore, the survival rate of the yeast isolate after continuous acid and bile treatment was equal to 60% compared to the control sample. In addition, the yeast isolate was able to reduce 5 Log of *Escherichia coli* population, which was significantly ($p < 0.05$) higher than those of the other studied foodborne bacteria. The isolate was also able to reduce the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* up to 4 Log, but it did not have an obvious inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*. The auto-aggregation ability of the isolate was about 40%. The isolated yeast was also resistant to all of the investigated antibiotics and relatively sensitive to ketoconazole and fluconazole antimycotic agents. The isolate had no hemolytic activity, and its antifungal activity against *Aspergillus niger* was also verified. In conclusion, the selected isolated yeast (*C. fabianii*) has a potential to be used as a probiotic and protective culture in fermentation industries.

Keywords: Probiotic yeasts, Barley sourdough, Antimicrobial effect, Protective culture.

Conflict of interest: None declared

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم از محصولات لبنی سنتی

مریم کاظمی میرکی^۱، الهام معظمیان^{۲*}، محمدجواد مختاری^۳، مهرداد غلامزاد^۴

۱. دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۳. گروه زیست شناسی، واحد زرقان، دانشگاه آزاد اسلامی، زرقان، ایران

۴. گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: elhammoazamian@gmail.com

چکیده:

لاکتوباسیلوس پلانتاروم یک باکتری مهم در صنایع غذایی است که به عنوان یک سویه مفید و کاربردی شناخته می‌شود. پتانسیل بالقوه ی پروبیوتیکی و توانایی ایجاد ایمنی از جمله مزیت‌های آن می‌باشد. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم از مواد لبنی انجام شد. ۹۶ نمونه از مواد لبنی سنتی از مناطق مختلف استان فارس جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در محیط کشت MRS تلقیح و مورفولوژی کلنی و شکل آنها بررسی شد. سپس رنگ آمیزی گرم و شناسایی ویژگی‌های بیوشیمیایی مانند تست کاتالاز، اکسیداز، تخمیر قندها و سیترات انجام شدند. در نهایت، با استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، تکثیر و توالی‌یابی ژن 16S rRNA انجام شد. با استفاده از روش‌های تشخیصی و بیوشیمیایی، ۱۱ جدایه‌ی باکتری لاکتوباسیلوس با موفقیت جداسازی شد و پس از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و توالی‌یابی، ۴ جدایه لاکتوباسیلوس پلانتاروم تایید شدند. هر ۴ جدایه گرم مثبت، کاتالاز، اکسیداز و سیترات منفی بودند و گلوکز، مانوز، ساکاروز و سوربیتول را تخمیر می‌کردند. تشخیص نهایی لاکتوباسیلوس پلانتاروم از طریق شناسایی مولکولی و تعیین توالی ژن 16S rRNA تأیید شد. نتایج نشان داد که باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در مواد لبنی وجود دارد و می‌توان با استفاده از بررسی شکل، ساختار، روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی، این گونه‌ی مهم را از مواد لبنی جداسازی کرد. همچنین، استفاده از روش‌های مورد استفاده در این تحقیق امکان جداسازی لاکتوباسیلوس پلانتاروم را فراهم می‌کند.

کلمات کلیدی: باکتری اسیدلاکتیک، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، مواد لبنی، شناسایی مولکولی، تست بیوشیمیایی

مقدمه:

قرار دارد (Hazards et al., 2018; Ray & Joshi, 2014).

سویه‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم که از غذاهای سنتی تخمیر شده استخراج شده‌اند، ویژگی‌های کاربردی بسیاری مانند خاصیت ضداکسیدانی دارند (Behera et al., 2018). یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های مطالعه شده سویه‌های بومی لاکتوباسیلوس پلانتاروم توانایی تولید باکتریوسین‌های پلانتاریسین، پپتیدهای ضد میکروب قابل استفاده در فرآورده‌های غذایی مختلف برای کاهش باکتری‌های حساس از جمله بیماریزها است (da Silva Sabo et al., 2014).

تخمیر مواد غذایی با استفاده از لاکتوباسیلوس پلانتاروم یک راهکار مناسب برای بهبود ارزش‌های تغذیه‌ای و محتوای ویتامینی محصولات غذایی است (Panda et al., 2018; Swain & Ray, 2016). افزودن ویتامین‌های تولید شده توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم (فولات، ریبوفلاوین، ویتامین B12 و غیره) به شیر تخمیری، ماست یا سویا می‌تواند غلظت ویتامین‌ها را افزایش داده و تأمین کننده مواد مغذی برای مصرف‌کنندگان باشد (Li et al., 2017). رژیم غذایی غنی از پروبیوتیک‌هایی مانند لاکتوباسیلوس پلانتاروم با پیشگیری و درمان برخی از اختلالات گوارشی، مانند سندرم روده تحریک‌پذیر، التهاب دستگاه گوارش در نوزادان و کولیت التهابی مرتبط شده است (Nouri et al., 2018).

آنزیم لیپاز موجود در لاکتوباسیلوس پلانتاروم در بسیاری از کاربردهای صنعتی مانند فرآوری غذا، سنتز آلی، ترکیب مواد شوینده و تولید روغن به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. آنزیم استراز لاکتوباسیلوس پلانتاروم منبعی برای بسیاری از استر هیدرولاز های میکروبی است زیرا می‌تواند طیف

بررسی‌های دقیق تاریخی نشان می‌دهد که مبدأ فرآورده‌های تخمیری لبنی نظیر ماست، کفیر و... به تمدن‌های اولیه بشری در حدود ده هزار سال قبل از میلاد بر می‌گردد. طیف وسیعی از فرآورده‌های تخمیری در مناطق روستایی به طور سنتی از دیرباز تولید می‌شود. بسیاری از این محصولات به تخمیر خودبخودی توسط میکروفلور طبیعی شیر (به طور عمده باکتری‌های لاکتیک) وابسته‌اند. از سوی دیگر، انجام هر نوع تخمیر به شرایط آب و هوایی منطقه تولید نیز بستگی دارد. باکتری‌های اسیدلاکتیک گروهی متنوع از باکتری‌های گرم مثبت و تولیدکننده ی لاکتیک اسید هستند که برای تغذیه و تخمیر غذا استفاده می‌شوند (Khushboo et al., 2023). لاکتوباسیلوس‌ها، جنس بسیار رایجی از این نوع باکتری‌ها هستند (Elagöz et al., 1996). از میان جمعیت گسترده لاکتوباسیلوس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم سویه‌ای بسیار چند منظوره و با خواص مفید است. لاکتوباسیلوس پلانتاروم یک باکتری اسیدلاکتیک هتروفرمانتاتیو اختیاری است. همچنین لاکتوباسیلوس پلانتاروم از سویه‌های پروبیوتیک رایج در صنایع لبنی است که به طور گسترده در فرمانتاسیون صنعتی و پردازش مواد خام غذایی استفاده می‌شود (Guidone et al., 2014).

لاکتوباسیلوس پلانتاروم به عنوان فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان دارای توانایی بالای بقا در دستگاه گوارش است و می‌تواند جذب فلزات سنگین روده‌ای را کاهش دهد و استرس اکسیداتیو کبدی را تسکین دهد. بر طبق تعریف سازمان غذا و کشاورزی و سازمان بهداشت جهانی و سازمان ملل متحد یک افزودنی مجاز است و در لیست پیش بینی معتبر ایمنی به عنوان گونه‌ی ایمن برای حیوانات و انسان

رفتار این باکتری در شرایط طبیعی بدن و سیستم گوارش میزبان به سختی امکان پذیر است. با توجه به گسترش فزاینده محصولات لبنی صنعتی به جای محصولات سنتی، امکان از دست دادن بسیاری از باکتری‌های اسیدلاکتیک وجود دارد. همچنین با توجه به فواید باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم و افزایش استفاده از محصولات لبنی به‌عنوان ابزاری برای انتقال میکروارگانیسم‌های مفید به دستگاه گوارش، جداسازی لاکتوباسیلوس پلانتاروم از محصولات لبنی سنتی می‌تواند مسیر مناسبی برای تولید انبوه محصولات لبنی سنتی سودمند به ما عرضه کند. بنابراین، هدف این تحقیق جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم از منابع لبنی سنتی استان فارس بود تا این سویه‌ی بومی به منظور استفاده در صنعت غذا و زیست پزشکی معرفی گردد.

مواد و روش کار:

جمع آوری نمونه :

۹۶ نمونه فرآورده لبنی سنتی (ماست و دوغ) از مناطق مختلف استان فارس (شیراز، نی ریز، استهبان، سروستان، دشت ارژن) در بازه‌ی یک هفته (فروردین ۱۴۰۱) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در فالكون و شرایط استریل و در مجاورت بسته‌های یخی به آزمایشگاه میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت منتقل گردیدند. نمونه‌ها تا شروع آزمایش در دمای یخچال (۴ درجه سلسیوس) نگهداری شدند. سویه استاندارد لاکتوباسیلوس پلانتاروم (کد ۱۰۵۸)، سویه/شرشیا کلی (کد ۱۳۹۹) به عنوان کنترل در تست‌های تشخیصی به صورت کشت فعال از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری شد. رقت 10^{-1} تا رقت 10^{-7} از نمونه‌ها تهیه و تلقیح بر روی محیط کشت MRS-Agar

گسترده‌ای از الکل‌های فنولی، استرهای زنجیره کوتاه و اسیدهای چرب تولید کند (Uppada et al., 2017).

شناسایی دقیق و قطعی میکروارگانیسم‌ها برای کاربردهای متنوعی از جمله مطالعات بیوتکنولوژیکی، صنعتی، زیست پزشکی، دارویی و زیست محیطی ضروری است. استفاده از توالی‌یابی ژن 16S rRNA و بررسی هم‌ترازی آن با سایر توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی برای شناسایی سویه‌های جدید دارای اهمیت است. گونه‌های باکتریایی حداقل یک نسخه از ژن 16S rRNA حاوی نواحی بسیار حفاظت شده دارند که برای شناسایی سویه‌های جدید استفاده می‌شود (Xue et al., 2021). در ایران، ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۱) موفق به جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس برویس از محصولات لبنی سنتی ماست و پنیر شدند (Narimani et al., 2013). امامی و همکاران (۲۰۰۸) از محصولات لبنی شهرستان فسا و جهرم استان فارس از طریق تست‌های بیوشیمیایی لاکتوباسیلوس بولگاریس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس فرمانتوم، لاکتوباسیلوس لاکتیس و لاکتوباسیلوس کازئی را جداسازی کردند (Emami & Noeiaghdam, 2008). علی‌رغم وجود چند تحقیق با هدف جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک در استان فارس، در این تحقیقات، سویه‌ی لاکتوباسیلوس پلانتاروم، به صورت هدفمند از محصولات لبنی سنتی از طریق تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی نشده است که مزیت این مطالعه محسوب می‌شود. با وجود اینکه، در این تحقیق باکتری لاکتوباسیلوس علاوه بر تست‌های بیوشیمیایی، با تجزیه و تحلیل ژن 16S rRNA شناسایی شده است، پیش‌بینی

تست تخمیر قندها یا تست (API Analytical Profile Index) :

تست تخمیر قند برای بررسی توانایی لاکتوباسیلوس ها در تخمیر قندها و تایید جنس و شناسایی عملکرد بیوشیمیایی باکتری ها مورد استفاده قرار گرفت. توانایی تخمیر قند لاکتوباسیلوس های جداسازی شده به وسیله تست API (مدل 20E - بیومریو، فرانسه) انجام شد. در این تست ۵ سی سی سوسپانسیون باکتری مورد نظر تهیه و در حفره های کیت که حاوی ترکیبات قندی لیوفلیزه شده می باشند وارد شد و طبق دستورالعمل سازنده، تخمیر قندهای گلوکز، مانوز، اینوزیتول، سوربیتول، رامنوز، ساکارز، آمیلوز و آرابینوز بررسی گردید. تخمیر قند توسط لاکتوباسیلوس سبب تغییراتی مانند تولید اسید یا گاز شد (Sun et al., 2022). تبدیل رنگ ارغوانی به زرد نشانه‌ی تخمیر قند در نظر گرفته شد. لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۱۰۵۸) به عنوان کنترل مثبت و *اشرشیا کلی* (۱۳۹۹) به عنوان کنترل منفی استفاده شد (Cretin et al., 2017).

شناسایی مولکولی به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR: Polymerase Chain Reaction)

Reaction) و با استفاده از ژن 16S rRNA: پس از انتخاب باکتری‌های گرم مثبت، کاتالاز، اکسیداز، سیترات منفی و دارای توانایی در تخمیر قند گلوکز، مانوز، سوربیتول و ساکارز، شناسایی مولکولی انجام شد. پرایمرهای مربوط به ژن 16S rRNA گونه لاکتوباسیلوس با استفاده از سایت National Center for Biotechnology (NCBI Information) و بررسی مقالات انتخاب شد. سپس واکنش PCR انجام شد و در نهایت برای مشاهده ژن 16S rRNA نمونه ها، الکتروفورز (BIO-RAD، سنگاپور) انجام شد (Hou et al., 2018).

(Man-Rogosa-Sharp) (مرک، آلمان) صورت گرفت. پلیت‌ها در شرایط بی‌هوایی، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. پس از گرماگذاری، کلنی‌های رشدیافته بر روی پلیت، انتخاب شدند و بعد از کشت‌های متوالی، سویه‌های خالص شده جداسازی شدند (Padasht et al., 2023).

رنگ آمیزی گرم:

تمایز و تشخیص لاکتوباسیلوس‌ها از سایر باکتری‌ها توسط رنگ آمیزی گرم انجام شد. باکتری‌های باسیلی شکل گرم مثبت (رنگ بنفش) انتخاب شدند (Haghshenas et al., 2017).

تست‌های بیوشیمیایی:

تست‌های مختلف بیوشیمیایی از جمله تست کاتالاز، تست اکسیداز و تست سیترات برای تشخیص و شناسایی لاکتوباسیلوس‌ها انجام شد. آزمایش کاتالاز با قرار دادن یک قطره پراکسید هیدروژن (مرک، آلمان) روی یک کلنی از میکروارگانیسم‌ها که روی یک لام میکروسکوپی قرار داده شده بود، انجام شد. تشکیل حباب یا کف، مثبت در نظر گرفته شد. تست اکسیداز توسط دیسک‌های حاوی تترامتیل پارافنلین دی آمین دی هیدروکلراید انجام شد، تولید رنگ ارغوانی، اکسیداز مثبت در نظر گرفته شد. در تست کاتالاز و اکسیداز، *اشرشیا کلی* (۱۳۹۹) به عنوان کنترل مثبت و سویه استاندارد لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۱۰۵۸) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. تست سیترات در محیط سیمون سیترات (سبز رنگ) (مرک، آلمان) حاوی معرف بروموتیمول بلو انجام شد و عدم تغییر رنگ محیط به آبی منفی در نظر گرفته شد. لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۱۰۵۸) به عنوان کنترل منفی استفاده شد (Shuhadha et al., 2015; Silva et al., 2017).

سانترفیوژ گردید، در این مرحله DNA استخراج شد (۲۰).

در واکنش PCR از توالی آغازگر رفت 5'-FLB190، 3'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3' توالی آغازگر RLB190 برگشت، 5'-CGG TAT TAG CAT CTG TTT CC-3' (SMOBIO) تایوان) استفاده شد (Hou et al., 2018).

DNA استخراج شده باکتری‌ها طبق برنامه زمان‌بندی در جدول ۱ تحت واکنش PCR گرایان (سیناکلون، ایران) قرار گرفتند. دستگاه ترموسایکلر (BIO-RAD، سنگاپور) در یک طیف دمایی بین ۵۴-۶۴ درجه سلسیوس تنظیم شد و بهترین دما براساس بهترین باند بر روی ژل الکتروفورز براساس مارکر شناسایی مولکولی انتخاب شد (Abadi et al., 2023). پس از انجام PCR، وجود یا عدم وجود محصول مورد نظر و انجام کامل و صحیح واکنش بررسی شد و محصول PCR با استفاده از ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید. پس از ۳۵ دقیقه، ژل بر روی دستگاه ترانس ایلومیناتور فرابنفش (COD-5، کیازن، ایران) قرار داده شد و باندهای DNA مشاهده گردید (Dubernet et al., 2002; Naji et al., 2021).

استخراج DNA باکتری از طریق کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت (سیناژن، ایران) انجام شد. طبق دستورالعمل موجود در کیت، ابتدا ۵ ml از باکتری مورد نظر درون میکروتیوب ریخته شد. به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۵۰۰ rpm سانترفیوژ انجام شد، مایع رویی را دور ریخته و رسوب با ۱۰۰ μl آنزیم لیزوزیم و ۱۰۰ μl بافر لیزکننده اولیه مخلوط شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شد، سپس ۲۵ μl آنزیم پروتئیناز K و ۲۰۰ μl محلول لیزکننده افزوده شد و در آن با دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس ۳۰۰ μl محلول ته‌نشینی اضافه و ۵ ثانیه ورتکس شد و به وسیله سمپلر به ستون منتقل شد و در دور ۱۲۰۰۰ rpm برای ۱ دقیقه سانترفیوژ شد. مایع دور ریخته شد و ۶۰۰ μl بافر شستشو I به ستون اضافه و سانترفیوژ (۱۲۰۰۰ rpm / ۱ دقیقه) شد و مایع دور ریخته شد، ۶۰۰ μl بافر شستشو II به ستون اضافه و سانترفیوژ (۱۲۰۰۰ rpm / ۱ دقیقه) شد. مایع رویی دور ریخته و سپس این مرحله تکرار گردید و لوله‌ی جمع‌آوری جدید گذاشته شد. ۳۰ μl بافر شستشو به آن اضافه گردید و ستون‌ها به مدت ۳ دقیقه در دمای ۶۵ درجه قرار داده شد و ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm

جدول ۱- شرایط دمایی و پروتکل واکنش PCR جدایه‌های لاکتوباسیلوس

تعداد سیکل	زمان	دما	مراحل
۱	۳ دقیقه	۹۴ °C	دناتوره شدن اولیه
۳۴	۳۰ ثانیه	۹۴ °C	دناتوره شدن
	۳۰ ثانیه	۵۵/۹ °C	اتصال
	۵۰ ثانیه	۷۲ °C	طویل شدن
۱	۵ دقیقه	۷۲ °C	طویل شدن نهایی

بی نهایت	۱۲-۴ °C	۱۲-۴ °C	نگه داری
----------	---------	---------	----------

نوری همه ی ۳۵ کلنی، به رنگ بنفش، گرم مثبت و بدون اسپور تشخیص داده شد. همچنین باسیلی بودن آن‌ها تایید گردید. مرفولوژی کلنی در شکل ۱- C آمده است.

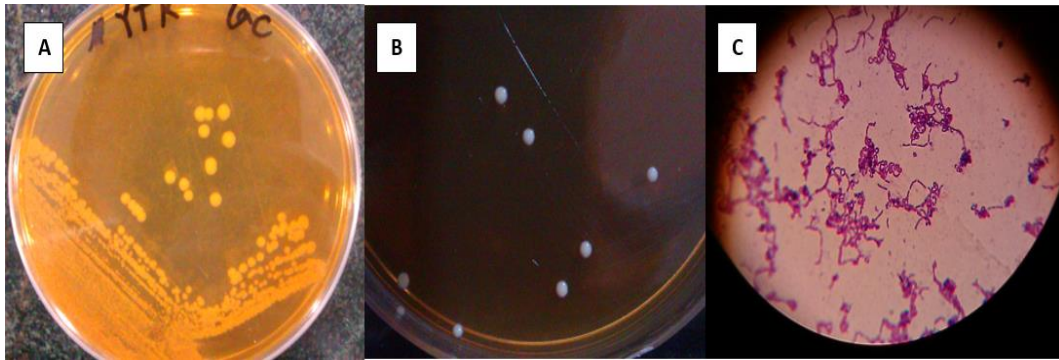
تعیین توالی به روش سنگر:

در نهایت، اطمینان از اختصاصی بودن آزمایش و تشخیص مولکولی جدایه ها توسط تعیین توالی محصول PCR با تکنیک سنگر (توالی یابی بر پایه خاتمه زنجیره) (میکروسینس سوئیس) توسط شرکت توپاز ژن (ایران) انجام شد. نتیجه ی توالی یابی نمونه های مورد آزمایش با توالی های موجود در بانک ژن با برنامه نوکلئوتید بلاست (Nucleotide blast) مقایسه گردید و میزان تشابه نمونه های توالی یابی شده با توالی موجود در بانک ژن مقایسه شد (Asaadi et al., 2019).

نتایج:

۹۶ نمونه از مناطق مختلف استان فارس جمع آوری شد. به طور کلی براساس تست های بیوشیمیایی و تخمیر قندها و شناسایی مولکولی ۱۱ جدایه لاکتوباسیلوس جداسازی شد، که از این تعداد، ۴ جدایه سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم تایید شدند. طبق تعریف فدراسیون بین المللی محصولات و سازمان بین المللی استاندارد، باکتری های اسیدلاکتیک گرم مثبت، بدون اسپور، کاتالاز منفی، سیتوکروم اکسیداز منفی هستند. همه باکتری های اسیدلاکتیک دارای متابولیسم تخمیری هستند و اسیدلاکتیک را به عنوان محصول نهایی تخمیر کربوهیدرات تولید می کنند.

از بین کلنی های رشد یافته در محیط کشت MRS آگار، ۳۵ کلنی که شکل ظاهری آنها سفید - کرمی و صاف بود، به کمک سوزن استریل برداشته شد (شکل ۱- A-B). سویه های جدا شده براساس محل نمونه برداری شماره گذاری گردید. طی انجام مراحل رنگ آمیزی گرم و مشاهده نمونه ها زیر میکروسکوپ



شکل ۱. بررسی ویژگی‌های ریخت شناسی باکتری‌های جداسازی شده از لبنیات سنتی استان فارس: A و B: ظاهر کلنی رشد یافته بر روی محیط کشت MRS آگار. C: نتیجه رنگ‌آمیزی گرم زیر میکروسکوپ.

جدول ۲ - تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌های استخراج شده از لبنیات سنتی استان فارس

س و په ها	آز مو ن م	ت س ت کا ت ال از	تس ت اک سی داز	تس ت اک سی داز	تس ت سی ترا ت	س و په ه ا	آز مو ن م	ت س ت کا ت ال از	تس ت اک سی داز	تس ت سی ترا ت
E 1	+	-	-	-	-	L D	+	-	-	-
E 2	+	+	+	+	-	L E	+	-	-	-
E 3	+	-	-	-	-	L F	+	+	-	-
E 4	+	-	-	-	-	L G	+	-	-	-
E 5	+	-	-	-	-	L H	+	-	-	-
E 6	+	-	-	-	-	L I	+	-	-	-
E 7	+	-	-	-	-	L J	+	-	-	-
E 8	+	-	-	-	-	L K	+	-	-	-
E 9	+	-	-	-	-	L L	+	-	-	-
E 10	+	-	-	-	-	L M	+	-	-	-
E 11	+	-	-	-	-	L N	+	-	-	-
E 12	+	-	-	-	+	L O	+	+	+	-
L A	+	-	-	-	-	L P	+	-	-	-
L B	+	+	+	-	-	L Q	+	-	-	-
L C	+	-	-	-	-	L R	+	-	-	-

-	-	-	+	L S	-	-	-	+	L Z
-	-	-	+	L V	-	-	-	+	L U
					-	-	-	+	L W

تشخیص عملکرد بیوشیمیایی جدایه‌ها، به وسیله‌ی آزمون اکسیداز و کاتالاز و سیترات انجام شد و جدایه‌ها بر اساس این سه تست انتخاب شدند. نتایج تست‌ها در جدول ۲ آورده شده است.

پس از اطمینان از گرم مثبت، اکسیداز منفی و کاتالاز منفی و سیترات منفی بودن جدایه‌های مورد نظر، آزمون تخمیر قند به عنوان تست تاییدی انجام شد و نمونه‌های لاکتوباسیلوس تشخیص داده شد، نتایج در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- تخمیر قندی توسط سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از لبنیات سنتی استان فارس

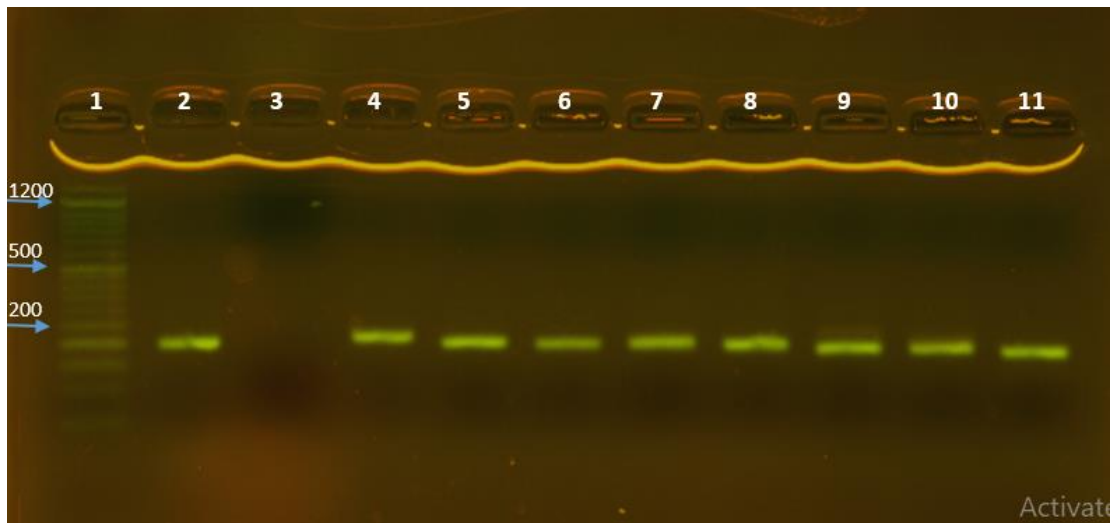
آرایی نوز	امی لوز	ساکاروز	رام نوز	سوربی تول	اینوزی تول	ما نوز	گلوکز	نمونه لبنیات
-	-	+	-	+	-	+	+	LI-LM - LS-E5
-	+	+	-	+	-	+	+	LC - LJ-LO - LV - L W
-	-/+	+	-	+	-	+	+	LZ - LH - LF-LK -LP

* نمونه‌های مناطق مختلف استان فارس: LI: ماست سنتی سروستان، LM: ماست سنتی نی ریز، LS: ماست سنتی دشت ارژن، E5: دوغ سنتی سروستان، LC: ماست سنتی استهبان، LJ: ماست سنتی شیراز، LO: پنیر سنتی شیراز، LV: دوغ سنتی استهبان، LW: دوغ سنتی دشت ارژن، LZ-LH: پنیر سنتی نی ریز، LF-LK: ماست محلی انجیره، LP: پنیر سنتی دشت ارژن.

شناسایی باکتری با استفاده از روش مولکولی
PCR
 DNA استخراج شده از نمونه‌ها بعد از قرار گرفتن در دستگاه ترموسایکلر، الکتروفورز شد. محصول

PCR ژن 16S rRNA جدایه‌های باکتری لاکتوباسیلوس با پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، قطعه‌ای به طول ۱۹۰ جفت باز می باشد. نتایج شناسایی مولکولی ژن 16S rRNA جدایه‌های

لاکتوباسیلوس که دارای باند مدنظر بودند در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن 16S rRNA جدایه‌های باکتری لاکتوباسیلوس: ستون ۱، مارکر ۵۰ جفت بازی شرکت SMOBIO؛ ستون ۲، کنترل مثبت لاکتوباسیلوس روتری؛ ستون ۳، کنترل منفی؛ ستون ۴-۱۱، جدایه‌های لاکتوباسیلوس (۱۹۰ جفت باز)

نوکلئوتید بلاست از ۱۱ جدایه، ۴ جدایه با هم‌ترازی بالای ۹۷٪ پلاننتاروم تشخیص داده شد (جدول ۴). جنس پلاننتاروم با ۳۶/۳۶ درصد بیشترین فراوانی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از محصولات لبنی مورد مطالعه را به خود اختصاص داد.

تعیین توالی

نتایج PCR جهت تایید و مشخص شدن جنس باکتری و توالی‌یابی توسط شرکت توپاز ژن به سوئیس فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی ۱۱ جدایه لاکتوباسیلوس را تایید و پس از همولوژی

جدول ۴ - نتایج بلاست نمونه‌های لاکتوباسیلوس تعیین توالی شده

کد نمونه	نتیجه‌ی بلاست (نزدیک ترین گونه)	درصد همولوژی	کد نمونه	نتیجه‌ی بلاست (نزدیک ترین گونه)	درصد همولوژی
E5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	۹۷/۸۹ %	LI	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain NWAUFU1572	۱۰۰ %
LS	<i>Lactobacillus plantarum</i> straiQn Gt4	۹۸ %	LM	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain NWAUFU1466	۹۹ %

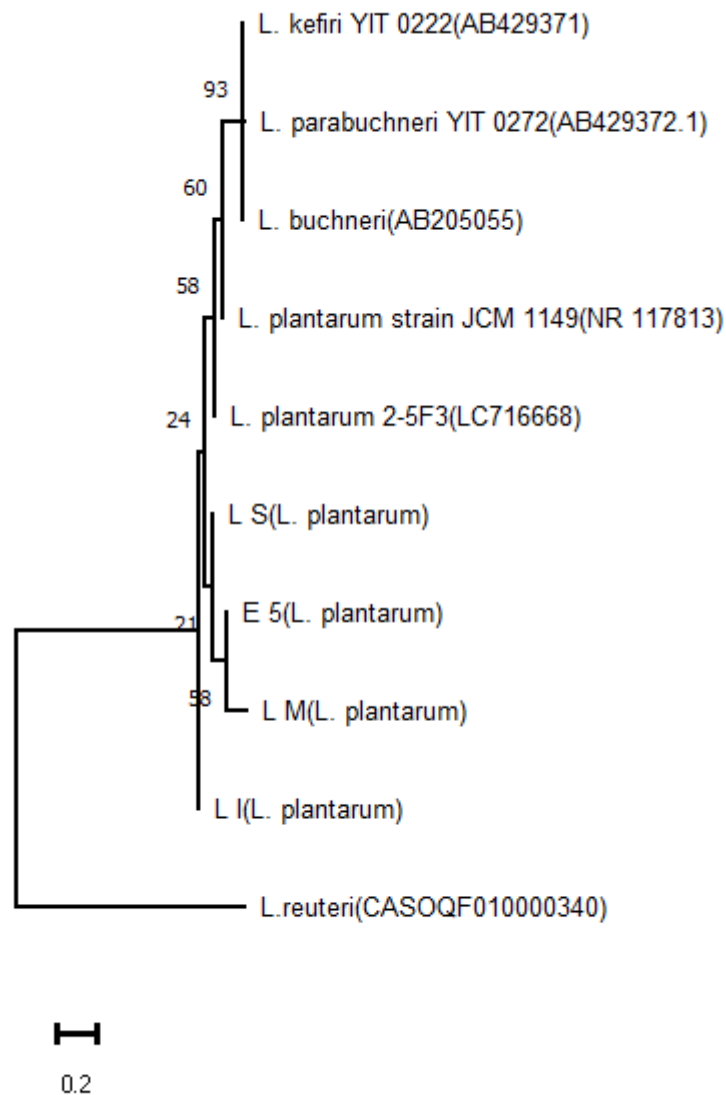
واحد تعداد جایگزینی‌های پایه قرار می‌گیرد. این تجزیه و تحلیل شامل ۱۰ توالی نوکلئوتیدی بود. درخت فیلوژنی حاصل، نشان دهنده‌ی ارتباط بین توالی‌های 16S rRNA جدایه‌های مذکور و توالی‌های مرجع (لاکتوباسیلوس روتری- لاکتوباسیلوس

ترسیم درخت فیلوژنتیکی:

درخت فیلوژنتیکی از روش Neighbour joining به دست آمد. فاصله‌های تکاملی با استفاده از روش احتمالی حداکثر کامپوزیت محاسبه شده و در هر

کفیری- لاکتوباسیلوی بوچنری و لاکتوباسیلوس

پاربوپنری) در بانک ژن می باشد(شکل ۳).



شکل ۳: درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbour joining بر مبنای توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA بین سویه‌های جداسازی شده از محصولات لبنی با دیگر سویه‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI و گروه خارجی (لاکتوباسیلوس روتری، لاکتوباسیلوس کفیری، لاکتوباسیلوی بوچنری و لاکتوباسیلوس پاربوپنری) ترسیم شده است. درصد شباهت گونه‌های مرتبط که در آزمون bootstrap (۵۰۰ تکرار) به هم خوشه‌ای شدند، در کنار شاخه‌ها نشان داده شده است. فاصله‌های تکاملی با استفاده از روش Maximum Composite Likelihood محاسبه شدند و در واحد تعداد جانشینی‌های پایه در هر سایت قرار دارند. این تجزیه و تحلیل شامل ۱۰ توالی نوکلئوتیدی بود. تمام موقعیت‌های مبهم برای هر جفت توالی حذف شدند. در مجموع ۱۶۸۴ موقعیت در مجموعه داده‌های نهایی وجود داشت. تجزیه و تحلیل تکاملی در MEGA11 انجام شد.

بحث :

با ۲۴/۳۴ درصد بیشترین فراوانی را داشت و باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم شناسایی نشد (Koohsari et al., 2019). دعوتی در سال ۱۳۹۶ در پژوهشی *انتروکوکوس فاسیوم*، *انتروکوکوس دورانس*، *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیزی*، *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس فرینتوشنسز*، *لاکتوباسیلوس جانسونی* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* را از ماست گوسفندی عشایر الوند جداسازی کرد (Davati, 2018). در منابع مختلف برای جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از محیط کشت MRS آگار استفاده شده و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۷۲ ساعت گزارش شده است. همچنین با توجه به گرم مثبت بودن باکتری لاکتوباسیلوس، آزمون گرم به عنوان روش تشخیصی ابتدایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بی و همکاران در سال ۲۰۱۹ از ماست طبیعی تخمیر شده، با بررسی مورفولوژی، رنگ‌آمیزی گرم و تشخیص مولکولی، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را جداسازی کردند (Yi et al., 2019). ونتاساوا و همکاران در سال ۲۰۱۷، سویه‌های لاکتوباسیلوس را از شیر تخمیر شده گاو بر روی MRS آگار جداسازی کردند، در این تحقیق جدایه‌های لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس بولگاریس* و *لاکتوباسیلوس سالواریوس* از لحاظ مورفولوژیکی، بررسی میکروسکوپی، بیوشیمیایی و سیستم تخمیر کربوهیدراتی مشخص گردید (Vantsawa et al., 2017). در تحقیق حاضر نیز با استفاده از محیط کشت مذکور کلنی‌های خالص لاکتوباسیلوس انتخاب شد و باکتری‌های گرم مثبت با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم تشخیص داده شد.

روش مرسوم در شناسایی لاکتوباسیلوس ها پس از جداسازی، آنالیز خصوصیات بیوشیمیایی آنها از

پژوهش حاضر ۹۶ نمونه محصول لبنی از مناطق مختلف جغرافیایی استان فارس را مورد بررسی قرار داد. ۳۱ میکروارگانیسم با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند که روی محیط کشت MRS شامل *باسیل‌های میله‌ای گرم مثبت* بودند، همچنین کاتالاز، سیتوکروم اکسیداز و سیترات منفی بودند. از طرفی تخمیر ۴ قند به عنوان عاملی برای تشخیص سویه‌ها استفاده شد. با استفاده از روش PCR، ۱۱ نمونه به عنوان لاکتوباسیلوس تایید شدند و پس از بررسی درصد همولوژی، ۴ سویه (۳۶/۳۶) درصد نتیجه تعیین توالی) مربوط به لاکتوباسیلوس پلانتاروم تشخیص داده شد.

با توجه به اهمیت باکتری‌های لاکتوباسیلوس و فواید آنها، جداسازی و شناسایی این باکتری‌ها از محصولات لبنی سنتی در سال‌های گذشته مورد توجه قرار گرفته است. جستجوی باکتری‌های سودمند در محصولات لبنی پتانسیل معرفی سویه‌های جدید جهت بهره‌برداری در صنایع غذایی را فراهم کرده است. دهقانی چم پیری و همکاران در سال ۲۰۲۳ لاکتوباسیلوس‌ها را از دوغ محلی استان چهارمحال و بختیاری جداسازی کردند، آنها باکتری‌های لاکتوباسیلوس *کازئی*، لاکتوباسیلوس *پارا کازئی*، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس *رامنوسوس*، لاکتوباسیلوس *جنسنی*، لاکتوباسیلوس *فرمنتوم* و لاکتوباسیلوس *برویس* را جداسازی نمودند (Dehghani Champiri et al., 2023).

کوهساری و همکاران در سال ۱۳۹۷ باکتری‌های اسیدلاکتیک از محصولات لبنی محلی شهرستان گرگان را جداسازی کردند که از ۲۴ نمونه دوغ و پنیر محلی و ۴ نمونه صنعتی، در مجموع ۷۳ جدایه شناسایی شدند که در این بین لاکتوباسیلوس *کازئی*

ژن 16S rRNA در بانک‌های اطلاعاتی، روشی مناسب برای شناسایی دقیق‌تر لاکتوباسیلوس‌ها است. اورشف و همکاران نیز در سال ۲۰۲۴ شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک را بر اساس کیت API 50 CH انجام دادند. سپس، باکتری‌ها بر اساس روش‌های مولکولی و تکثیر ژن 16S rRNA و 23S rRNA در سطح جنس و گونه شناسایی شدند (Urshev et al., 2024). رهی و مرحمتی زاده در سال ۲۰۲۲ در پژوهشی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس پاراکازئی را از محصولات لبنی سنتی شهرستان گچساران جداسازی کردند، آنها از آنالیز بیوشیمیایی مانند تست کاتالاز، اکسیداز، احیای نیترات، تخمیر قند ها و روش مولکولی برای شناسایی سویه‌های لاکتوباسیلوس استفاده کردند (Rahi & Marhamatizadeh, 2022). همچنین، لیو و همکاران در سال ۲۰۲۱ باکتری‌های لاکتوباسیلوس مشتق شده از سبزیجات تخمیری در شانسی، چین را از روش مولکولی و بررسی توالی ژن 16S rRNA شناسایی کردند و توانستند ۱۵ جدایه لاکتوباسیلوس پلانتاروم و ۹ جدایه لاکتوباسیلوس برویس را جداسازی کنند (Liu et al., 2022). وجود لاکتوباسیلوس پلانتاروم در محصولات لبنی سنتی در مطالعه ظفرمختاریان و همکاران در سال ۲۰۱۸ گزارش شده است. این محققین حضور لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس رامنوزوس و لاکتوباسیلوس بوجنری را در نمونه‌های شیر و ماست گوسفندی روستاهای شهرستان ارومیه را با تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از PCR تایید نمودند (Zafar mokhtarian et al., 2018). تادسه و همکاران در سال ۲۰۱۸ جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک را انجام دادند، این مطالعه حضور گونه‌های مختلف باکتریایی را در خمیر تف تخمیری

جمله تست کاتالاز، اکسیداز، سیترات و تخمیر قندها است. در منابع مختلف نوع و تعداد قندها متفاوت است. حسن و همکاران در سال ۲۰۲۲ به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های لاکتوباسیلوس، از روش‌های رنگ‌آمیزی گرم، فعالیت کاتالاز و اکسیداز، و تولید اسید از گلوکز استفاده نمودند (Hassan et al., 2023). ناجی و همکاران در سال ۲۰۲۱، از تست تخمیر قندی شامل قندهای آرابینوز، ترهالوز، ساکاروز، رافینوز، رامنوز، لاکتوز، مانیتول و مالتوز، سوربیتول و زایلوز به منظور شناسایی گونه‌های لاکتوباسیلوس استفاده کردند. بیشترین فراوانی به ترتیب متعلق به لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۷ نمونه) و لاکتوباسیلوس اجلیس (۶ نمونه) به دست آمد و کمترین فراوانی در لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پنتیس بود (Naji et al., 2021). نوری و همکاران در سال ۲۰۱۸ باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم را به روش بیوشیمیایی و مولکولی جداسازی و شناسایی کردند که لاکتوباسیلوس پلانتاروم در میان گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس عادت پذیرترین گونه شناخته شد (Nouri et al., 2018). در این تحقیق نیز تمامی جدایه‌ها کاتالاز، اکسیداز و سیترات منفی تشخیص داده شدند و از تخمیر قندهای گلوکز، مانوز، اینوزیتول، سوربیتول، رامنوز، ساکارز، آمیلوز و آرابینوز برای شناسایی بیوشیمیایی لاکتوباسیلوس‌ها استفاده شد. با مقایسه نتایج بیوشیمیایی باکتری‌های مورد بررسی، سویه‌های لاکتوباسیلوس تشخیص داده شد. در منابع مختلف توصیه شده است که از روش‌های مولکولی تکمیلی برای تایید تشخیص سویه‌های جدا شده بهره‌گیری شود زیرا شباهت خصوصیات فیزیولوژی در بین برخی جدایه‌ها دیده می‌شود. استفاده از مارکرهای مولکولی مانند مقایسه‌ی توالی

شاخص‌های میکروارگانیزم‌های پروبیوتیک از جمله میزان بقا و تحمل شرایط اسیدی معده و املاح صفراوی روده، در کنار انجام این آزمون‌ها در شیشه (in vivo) در حیوانات آزمایشگاهی مورد آزمون قرار گیرد (Koohsari et al., 2019; Taye et al., 2021). با توجه به نتیجه‌ی این تحقیق می‌توان امیدوار بود از جدایه‌هایی همچون لاکتوباسیلوس پلانتاروم به عنوان باکتری‌های بومی سودمند در تولید محصولات لبنی و صنایع غذایی استفاده شود.

نتیجه گیری کلی:

نتایج این تحقیق که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت انجام شد، حضور لاکتوباسیلوس پلانتاروم که از مفیدترین باکتری‌های پروبیوتیک و اسیدلاکتیک هستند، را در محصولات لبنی سنتی استان فارس اثبات کرد. علاوه بر این، جنس لاکتوباسیلوس پلانتاروم، ۳۶/۳۶ درصد از فراوانی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از محصولات لبنی مورد مطالعه را به خود اختصاص داد.

با استفاده از ژن 16S rRNA تایید کرده است (Tadesse et al., 2018). در این تحقیق نیز برای تشخیص دقیق‌تر و شناسایی باکتری‌ها، DNA نمونه‌ها استخراج و ژن 16S rRNA تکثیر شد و سپس با ژل الکتروفورز مشاهده شد. نتایج تعیین توالی، ۱۱ جدایه‌ی لاکتوباسیلوس را تایید کرد. از این ۱۱ جدایه، ۴ جدایه پلانتاروم و بقیه، سویه‌های دیگر لاکتوباسیلوس شناسایی شدند. در تحقیقات مشابه، فراوان‌ترین لاکتوباسیلوس‌های موجود در محصولات لبنی شهرستان جهرم، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم معرفی شدند. تفاوت در سویه‌های جداسازی شده‌ی لاکتوباسیلوس در مناطق مختلف ایران احتمالاً به دلیل تفاوت اقلیم و آب و هوا است. بنابراین، شناسایی مولکولی و شباهت توالی ژن 16S rRNA باکتری‌ها نقش تعیین کننده‌ای در شناسایی باکتری دارد (Dorri et al., 2013). علی‌رغم شناسایی مولکولی این جدایه، پیش بینی دقیق توانایی تکثیر این باکتری در محیط روده مشکل است، بنابراین پیشنهاد می‌شود جهت معرفی این جدایه به عنوان پروبیوتیک بومی، دیگر

- Abadi, M. E. G. M., Hosseini-Safa, A., Habibi, S., Dehghan, M., Forouzani-Moghaddam, M. J., & Oshaghi, M. (2023). Isolation and characterization of the *Lactobacillus* strain from honey and its probiotic properties. *Iranian journal of microbiology*, 15(3), 439.
- Asaadi, H., Eshaghi Milasi, Y., & Yazdansetad, S. (2019). Isolation and molecular identification of carotenoid-producing bacteria. *Nova Biologica Reperta*, 6(1), 61-69.
- Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed research international*, 2018(1), 9361614.
- Cretin, B., Philippi, N., Bousiges, O., Dibitonto, L., Sellal, F., Martin-Hunyadi, C., & Blanc, F. (2017). Do we know how to diagnose epilepsy early in Alzheimer's disease? *Revue neurologique*, 173(6), 374-380.
- da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., & de Souza Oliveira, R. P. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 527-536.
- Davati, N. (2018). Isolation and Identification of Indigenous Lactic Acid Bacteria from Traditional Yogurt Produced from Ewe's Milk from Alvand Nomads Region and Evaluation of Their Acidifying Potential. *Journal of food science and technology(Iran)*, 15(74), 222-213.
- Dehghani Champiri, I., Bamzade, Z., Rahimi, E., & Rouhi, L. (2023). Isolation of Lactic Acid Bacteria from Local Yogurt Samples in Chaharmahal and Bakhtiari Province: The Assessment of Probiotic Characteristics. *Iran J Med Microbiol* 17(6), 669-679.
- Dorri, K., Namdar, N., & HemayatkhahJahromi, V. (2013). Isolation of lactobacilli from dairy products and their effects on the main pathogenic bacteria in stomach and intestine. *Medical Laboratory Journal*, 7(1), 22-28.
- Dubernet, S., Desmasures, N., & Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of *Lactobacilli* at the genus level. *FEMS microbiology letters*, 214(2), 271-275.
- Elagöz, A., Abdi, A., Hubert, J.-C., & Kammerer, B. (1996). Structure and organisation of the pyrimidine biosynthesis pathway genes in *Lactobacillus plantarum*: a PCR strategy for sequencing without cloning. *Gene*, 182(1-2), 37-43.
- Emami, A., & Noeiaghdam, R. (2008). Cholesterol Assimilation with Isolated *Lactobacilli* Strains of Fars' Local Dairy Products. *Armaghane Danesh*, 13(3), 45-56.
- Guidone, A., Zotta, T., Ross, R. P., Stanton, C., Rea, M. C., Parente, E., & Ricciardi, A. (2014). Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains: A multivariate screening study. *LWT-Food Science and Technology*, 56(1), 69-76.
- Haghshenas, B., Nami, Y., Almasi, A., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., Barzegari, A., & Khosroushahi, A. Y. (2017). Isolation and characterization of probiotics from dairies. *Iranian journal of microbiology*, 9(4), 234.
- Hassan, A. A. M., Sakr, S. S., Ali, A. A., Mohamed Ahmed, I. A., & Elkashef, H. (2023). Isolation, identification, and biochemical characterization of five *Lacticaseibacillus* strains from Ovgtt: A traditional fermented and dried buttermilk. *Food Science & Nutrition*, 11(2), 1040-1050.
- Hazards, E. P. o. B., Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Girones, R., Koutsoumanis, K., Lindqvist, R., & Nørrung, B. (2018). Update of the list of

- QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 7: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2017. *Efsa Journal*, 16(1), e05131.
- Hou, Q., Bai, X., Li, W., Gao, X., Zhang, F., Sun, Z., & Zhang, H. (2018). Design of primers for evaluation of lactic acid bacteria populations in complex biological samples. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2045.
- Khushboo, Karnwal, A., & Malik, T. (2023). Characterization and selection of probiotic lactic acid bacteria from different dietary sources for development of functional foods [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 14.
- Koohsari, H., Rashti, Z., & Arab, S. (2019). The Isolation of lactic acid bacteria from local dairy products of Gorgan township with the ability to inhibit the growth of some gastrointestinal pathogens. *Journal of Food Microbiology*, 6(3), 22-36.
- Li, P., Gu, Q., Yang, L., Yu, Y., & Wang, Y. (2017). Characterization of extracellular vitamin B12 producing *Lactobacillus plantarum* strains and assessment of the probiotic potentials. *Food chemistry*, 234, 494-501.
- Liu, C., Xue, W.-j., Ding, H., An, C., Ma, S.-j., & Liu, Y. (2022). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented vegetables in Shaanxi, China. *Frontiers in Microbiology*, 12, 774903.
- Naji, M., Norouzi, J., & Saffarian, P. (2021). Antimicrobial properties of *lactobacilli* isolated from soya on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. *Research in Medicine: Journal of Research in Medical Sciences*, 45(2).
- Narimani, T., Tarinejad, A., & Hejazi, M. A. (2013). Isolation and identification of lactic acid bacteria from traditional dairy products of Kleibar, Heris and Varzaghan. *Food Hygiene*, 3(Autumn 3(11)), 23-37.
- Nouri, S., Nazari, S., & Hosseyni, P. (2018). Isolation and Biochemical and Molecular Identification of *Lactobacillus Plantarum* Bacteria from Rhizosphere of Lenjan Rice. *Biological Journal of Microorganism*, 7(27), 61-71.
- Padasht, N., Issazadeh, K., & Shah Illi, M. (2023). Cytotoxic Effects of *Lactobacillus Cytoplasmic* Extract isolated from Guilan province dairy products on Colon Cancer Cell Line (HT-29). *Biological Journal of Microorganism*, 12(46), 13-25.
- Panda, S. K., Ray, R. C., Mishra, S. S., & Kayitesi, E. (2018). Microbial processing of fruit and vegetable wastes into potential biocommodities: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(1), 1-16.
- Rahi, A., & Marhamatizadeh, M. H. (2022). Investigating the Inhibitory Effect of Probiotic *Lactobacillus* Species Isolated From Dairy Products. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 9(3), 103-108.
- Ray, R. C., & Joshi, V. (2014). Fermented foods: past, present and future. *Microorganisms and fermentation of traditional foods*, 1-36.
- Shuhadha, M., Panagoda, G., Madhujith, T., & Jayawardana, N. (2017). Evaluation of probiotic attributes of *Lactobacillus* sp. isolated from cow and buffalo curd samples collected from Kandy. *The Ceylon medical journal*, 62(3), 159-166.
- Silva, L. F., Casella, T., Gomes, E. S., Nogueira, M. C. L., De Dea Lindner, J., & Penna, A. L. B. (2015). Diversity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Journal of food science*, 80(2), M411-M417.
- Sun, J., Silander, O., Rutherford-Markwick, K., Wen, D., Davy, T. P.-p., & Mutukumira, A. N. (2022). Phenotypic and genotypic characterisation of *Lactobacillus* and yeast isolates from a traditional New Zealand Māori potato starter culture.

- Current Research in Food Science*, 5, 1287-1294.
- Swain, M. R., & Ray, R. C. (2016). Nutritional values and bioactive compounds in lactic acid fermented vegetables and fruits. *Lactic acid fermentation of fruits and vegetables*, 1, 37-52.
- Tadesse, B. T., Tesfaye, A., Muleta, D., Bahiru, A., Terefework, Z., & Wessel, G. (2018). Isolation and molecular identification of lactic acid bacteria using 16s rRNA genes from fermented Teff (*Eragrostis tef* (Zucc.)) dough. *International journal of food science*, 2018(1), 8510620.
- Taye, Y., Degu, T., Fesseha, H., & Mathewos, M. (2021). Isolation and identification of lactic acid bacteria from cow milk and milk products. *The Scientific World Journal*, 2021(1), 4697445.
- Uppada, S. R., Akula, M., Bhattacharya, A., & Dutta, J. R. (2017). Immobilized lipase from *Lactobacillus plantarum* in meat degradation and synthesis of flavor esters. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 331-334.
- Urshev, Z., Doynova, D., Prasev, I., Denkova-Kostova, R., Koleva, A., Denkova, Z., Goranov, B., & Kostov, G. (2024). Identification of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Sourdoughs Prepared with Different Flour Types. *Applied Sciences*, 14(5), 2093.
- Vantsawa, P. A., Maryah, U. T., & Bulus, T. (2017). Isolation and identification of lactic acid bacteria with probiotic potential from fermented cow milk (nono) in Unguwar Rimi Kaduna State Nigeria. *American Journal of Molecular Biology*, 7(2), 99-106.
- Xue, Z., Brooks, J. T., Quart, Z., Stevens, E. T., Kable, M. E., Heidenreich, J., McLeod, J., & Marco, M. L. (2021). Microbiota assessments for the identification and confirmation of slit defect-causing bacteria in milk and Cheddar cheese. *Msystems*, 6(1), 10.1128/msystems.01114-01120.
- Yi, R., Tan, F., Liao, W., Wang, Q., Mu, J., Zhou, X., Yang, Z., & Zhao, X. (2019). Isolation and identification of *Lactobacillus plantarum* HFY05 from natural fermented yak yogurt and its effect on alcoholic liver injury in mice. *Microorganisms*, 7(11), 530.
- Zafar mokhtarian, E., Rezazadeh Bari, M., & Amiri, S. (2018). Isolation and molecular identification of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from sheep milk and yogurt. *Journal of food science and technology(Iran)*, 15(79), 243-252.

Isolation and molecular identification of *Lactobacillus plantarum* bacteria from traditional dairy products

Kazemimiraki M¹, Moazamian E^{2*}, Mokhtari MJ³, Gholamzad M⁴

1. Ph.D. student, Department of Genetics, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
3. Department of Biology, Zarghan Branch, Islamic Azad University, Zarghan, Iran
4. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: elhammoazamian@gmail.com

Abstract:

Lactobacillus plantarum is an important bacterium in the food industry recognized as a useful and practical strain. The advantages of lactic acid bacteria, including *Lactobacillus* species, are their potential probiotic properties and their ability to induce immune responses. This study investigated the isolation and identification of *Lactobacillus plantarum* from dairy products. 96 samples of traditional dairy products were collected from different regions of the Fars province. The samples were cultured on MRS agar media and their colony morphology and shape were investigated. Then, Gram staining and biochemical tests such as catalase, oxidase, sugar fermentation, and citrate utilization were performed to identify the biochemical characteristics of *Lactobacillus* species. Finally, using molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) targeting the 16S rRNA gene and sequencing the desired sequence, the genetic identification of *Lactobacillus* species was performed. Using diagnostic and biochemical methods, 11 *Lactobacillus* isolates were successfully isolated, and after polymerase chain reaction and sequencing, 4 isolates were confirmed as *Lactobacillus plantarum*. All 4 isolates were Gram-positive, catalase-negative, oxidase-negative, and citrate-negative, and they fermented glucose, mannose, sucrose, and sorbitol. The final diagnosis of this bacterium was confirmed by molecular identification and sequencing of the 16S rRNA gene. The results indicate the presence of *Lactobacillus plantarum* in dairy products and it is possible to isolate this important species from dairy products by examining the shape, biochemical and molecular methods. Furthermore, the use of the methods employed in this study as diagnostic indicators enables isolation of *Lactobacillus plantarum*.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, dairy products, molecular identification, biochemical tests.

فعالیت ضدباکتریایی شیر گاو تخمیر شده بوسیله دانه‌های کفیر علیه تعدادی از باکتریهای بیماری‌زا فعالیت ضدباکتریایی شیر گاو تخمیر شده ...

هادی کوهساری^{۱*}، سیده ثریا سجادی^۲، عراز سلطان ساعدی فر^۲، مریم صادق شش پلی^۳

^۱ دانشیار گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

^۲ دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد مینودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مینودشت، ایران

^۳ دانش آموخته دکتری تخصصی پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

* نویسنده مسئول: hadikoohsari@yahoo.com

چکیده

نوشیدنی کفیر از قدیمی‌ترین محصولات تخمیری شیر است که پروبیوتیک طبیعی و کمپلکسی از یک مجموعه همزیستی میکروبی است که از تخمیر شیر به وسیله دانه‌های کفیر حاصل می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاو علیه ۱۰ باکتری بیماری‌زا می‌باشد. دانه‌های کفیر به شیر گاو (پرچرب و کم چرب) افزوده و عمل تخمیر در ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. دانه‌ها از عصاره کفیر جدا و فعالیت ضدباکتریایی عصاره کفیر علیه ۱۰ باکتری بیماری‌زا با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های کفیر تهیه شده در ۳۷ درجه سانتیگراد در مقایسه با نمونه‌های ۲۵ درجه سانتیگراد فعالیت ضدباکتریایی بیشتری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و ایزوله بومی *کلبسیلا پنومونیه*، نشان دادند. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر علیه *انتروکوکوس فکالیس* و *شیگلا دیسانتری* مربوط به نمونه‌های تهیه شده با شیر کم‌چرب در دمای ۳۷ درجه به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۸/۵ و ۱۲/۵ میلی‌متر بود. نمونه‌های تهیه شده با شیر پرچرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۲۲ و ۱۹ میلی‌متر، فعالیت ضدباکتریایی بیشتری علیه سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* نشان دادند. در خصوص *اشریشیا کلی* اعم از ایزوله بومی و سویه استاندارد و *سالمونلا تیفی موریوم*، اختلاف معناداری از نظر تاثیر نوع شیر و دمای تخمیر بر فعالیت ضدباکتریایی در بین تیمارها مشاهده نشد ($P > 0/05$). *باسیلوس سرئوس* مقاومت قابل ملاحظه‌ای نسبت به نمونه‌های کفیر از خود نشان داد. با توجه به فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاو استفاده از این نوشیدنی تخمیری توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: کفیر، فعالیت ضد باکتریایی، شیر گاو، باکتریهای بیماری‌زا

مقدمه

تاریخچه استفاده از میکروارگانیسم های زنده در غذا به ویژه باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک به منظور حفظ و بهبود سلامت انسان بسیار طولانی است. فرآورده های لبنی اولین نوع از محصولات پروبیوتیکی بوده اند که مورد استفاده بشر قرار گرفته اند. پروبیوتیکها میکروارگانیسمهای زندهای هستند که وقتی به مقدار کافی از آن ها مصرف می شود اثرات مفیدی بر سلامت انسان دارد (Fuller, 1989). پروبیوتیک ممکن است یک سویه واحد، یا مجموعه ای از میکروارگانیسمهای مختلف باشد که میتوانند از طریق فعالیتهای سیستم ایمنی، فعالیت های متابولیک و مانع در برابر فرآیندهای پاتولوژیک، باعث افزایش سلامتی شود. کفیر مثالی از یک پروبیوتیک است که انواع مختلفی از باکتری های و مخمرها در آن حضور دارند (Simova, et al., 2002).

نوشیدنی کفیر از جمله قدیمی ترین محصولات تخمیری شیر است که یک پروبیوتیک طبیعی و نوشابه ای الکلی-لاکتیکی است که از تخمیر شیر به وسیله دانه های کفیر حاصل می شود. مصرف کفیر در ارتقای سلامت مؤثر است و سبب بالا بردن سیستم ایمنی بدن، متعادل کردن فشار خون، درمان بیماریهای گوارشی و کاهش سطح کلسترول سرم می شود و همچنین دارای فعالیتهای ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد توموری می باشد (Farnworth, 2005). طیف وسیعی از ترکیبات فعال زیستی از جمله اسیدهای آلی، CO₂، پراکسید هیدروژن، اتانول، پپتیدهای فعالی زیستی، آگزوبلی ساکاریدهایی مانند کفیران، باکتریوسین ها از تخمیر دانه های کفیر تولید می شوند که به طور مستقل یا با یکدیگر مزایای سلامتی مختلفی مرتبط با مصرف کفیر را باعث می شوند. محصولات اصلی تخمیر کفیر، اسید لاکتیک، اتانول، و CO₂ هستند که ویسکوزیته، اسیدیته و مقدار کم الکل این نوشیدنی را مهیا می کنند. اجزای جزئی از جمله دی استیل، استالدهید، اتیل و اسیدهای آمینه نیز به طعم این نوشیدنی تخمیری کمک می کنند (Ratray and O'Connel, 2011).

در طی فرایند تخمیر باکتری های لاکتیک موجود در دانه های کفیر، اسید لاکتیک و مخمرها الکل و دی اکسید کربن تولید مینمایند. مقادیر اسید لاکتیک، الکل و دی

اکسیدکربن موجود در کفیر تحت تاثیر زمان و درجه حرارت گرمخانه گذاری تغییر می کند (Robinson, 1991).

دانه های کفیر، دانه های ژله ماندنی شبیه گل کلم کوچک هستند. طول آنها ۱ تا ۳ سانتی متر، دارای لبه و شکل نامنظم و به رنگ سفید تا زرد و دارای یک بافت لزج اما محکم هستند (LaRivière, et al. 1967; Farnworth, 2005).

دانه های کفیر وقتی به شیر تازه منتقل می شوند، زنده می مانند و در این مدت تقریباً ۲۰ ساعت رشد می کنند و جرم آنها ۲۵ درصد افزایش می یابد (Farnworth, 2005).

دانه های کفیر نمونه ای از همزیستی بین مخمر و باکتریها است. میکرو فلور دانه های کفیر به طور قابل توجهی پایدار است و اگر تحت شرایط کشت و فیزیولوژیکی مناسب نگهداری و انکوبه شود، فعالیت خود را برای سالها حفظ می کند. نسبت دانه به شیر، زمان و دما انکوبه گذاری، بهداشت در حین جداسازی دانه های کفیر، شستشوی دانه ها و نگهداری در سرما، همه به شدت بر کیفیت محصول و میکرو فلور دانه های کفیر تأثیر می گذارد (Gao and Li, 2016).

میکروارگانیسم های رایج جدا شده از دانه های کفیر در مناطق مختلف تفاوت هایی با هم دارند. باکتری های دانه ها معمولاً گونه های مختلف باکتری های اسید لاکتیک از جنس های لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس، استرپتوکوکوس و لاکونوستوک هستند. همچنین باکتری های اسید استیک و گونه های استوباکتر در کنار مخمرهایی از جنس ساکارومایسس، کاندیدا، کلویورومایسس، زیگوساکارومایسس، رودوتورولا از میکروفلور موجود در دانه های کفیر می باشند. ترکیب میکروبی کلی کفیر پیچیده است و مشخص است که از منطقه ای به منطقه دیگر متفاوت است. محیط کشت نگهداری و شرایط نگهداری از عوامل اصلی منجر به تنوع میکروبی دانه های کفیر است (Schwan et al., 2014).

باکتری های اسیدلاکتیک موجود در دانه های کفیر به دلیل توانایی رقابت و مهار رشد میکروارگانیسم های بیماریزا و عامل فساد، چه با تولید اسیدلاکتیک و چه با افزایش بیان ترکیبات ضد میکروبی، توجه قابل توجهی را به خود جلب کرده اند (Kourkoutas, et al., 2007).

پنومونیه (ایزوله بومی و سویه استاندارد PTCC 1290) و سه باکتری گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1154) و *انتروکوکوس فکالیس* (PTCC 1778) بودند. سویه های استاندارد به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند و در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گنبدکاووس در محیط BHI و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد احیاء شدند. آنگاه چند کلنی یک دست از کشت ۲۴ ساعته هر باکتری به محیط کشت نوترینت برات تلقیح شد و در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد تا کدورتی معادل 0.5×10^8 CFU/ml فارلند حاصل شود (Weinstein, et al., 2018).

بررسی اثرات ضد باکتریایی به روش چاهک

فعالیت ضدباکتریایی عصاره های کفیر، بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور از سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند (10^8 CFU/ml) (۱/۵) باکتریهای پاتوژن مورد آزمون با سوآپ استریل در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت یکنواخت تهیه شد. سپس با کمک چوب پنبه سوراخ کن استریل چاهک هایی به قطر ۸ میلی متر در محیط حفر شد و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره های کفیر در داخل چاهک ها ریخته و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. پس از این مدت با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک ها حساسیت یا مقاومت باکتری های مورد آزمون تعیین شد. (Weinstein, et al., 2018)

تجزیه و تحلیل آماری

متغیرهای مستقل تحقیق شامل نوع کفیر (نمونه های کفیر تهیه شده از شیر گاو پرچرب و کم چرب)، دمای تخمیر (۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد) و نوع باکتری بیماری زا (۱۰ گونه باکتری) و متغیر وابسته تحقیق فعالیت ضدباکتریایی (قطر هاله عدم رشد هر یک از باکتریهای بیماری زا در مواجهه با نمونه های کفیر) نمونه های کفیر تهیه شده می باشند. هر آزمون حداقل در سه تکرار انجام شد و داده های حاصل بر اساس طرح کاملاً تصادفی و به کمک ANOVA یا آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین ها با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح معنی

ظرفیت تولید مثل دانه های کفیر به طور قابل توجهی تحت تاثیر شرایط رشد قرار دارد. در شرایط نامساعد، رشد دانه کفیر مختل می شود، ظاهر آنها بدتر می شود و انعطاف پذیری آنها از دست می رود، کوچک می شوند و تعادل میکروبیولوژیکی آنها مختل می شود. در حالی که در شرایط مساعد، پس از پاساژهای متعدد در شیر، ظاهر معمولی، عملکردهای فیزیولوژیکی و خصوصیات تکنولوژیکی خود را بازیابی می کنند (Pop, et al., 2014).

ماده خام اصلی کفیر، شیر گاو است. این مطالعه با هدف بررسی فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو علیه ۱۰ باکتری بیماریزا شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا دیسانتری*، *انتروکوکوس فکالیس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشریشیا کلی* (ایزوله بومی و سویه استاندارد) و *کلبسیلا پنومونیه* (ایزوله بومی و سویه استاندارد)، انجام شد.

مواد و روش کار

آماده سازی عصاره های کفیر

دانه های کفیر از فروشگاه پریبوتیک تهیه شد و فرایند احیاء و تخمیر دانه مطابق روش ارائه شده توسط عجم و کوهساری (۲۰۲۰) انجام شد. بطور خلاصه دانه ها با ساب کالچرهای متوالی در شیر به مدت ۴ روز در ۲۵ درجه سانتیگراد احیاء شدند. شیر هر ۲۴ ساعت تعویض گردید. پس از احیاء، دانه های کفیر با آب مقطر استریل شسته شدند و ۵ گرم از آن ها به ۵۰ میلی لیتر شیر گاو پرچرب (۳/۲۵ درصد) و کم چرب (۱ درصد) تلقیح شد و در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. پس از بازه زمانی تخمیر (۴۸ ساعت) دانه های کفیر از محصول تخمیری جدا شدند. عصاره های کفیر تا زمان انجام آزمون های فعالیت ضدباکتریایی در دمای یخچال نگهداری شدند. (Ajam and Koohsari, 2020)

آماده سازی سویه های باکتریایی مورد آزمون

فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر در مجموع علیه ۱۰ باکتری مورد بررسی قرار گرفت. از این ۱۰ باکتری، ۷ باکتری گرم منفی شامل *اشریشیا کلی* (ایزوله بومی و سویه استاندارد PTCC 1338)، *شیگلا دیسانتری* (PTCC 1188)، *سالمونلا تیفی موریوم* (PTCC 1596)، *سودوموناس آئروژینوزا* (PTCC 1811) و *کلبسیلا*

جدول ۱ و شکل ۱ میانگین قطر هاله عدم رشد باکتریهای مورد آزمون را در مواجهه با نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو را نشان می دهد که حاکی از فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو است.

داری $P < 0.05$ صورت گرفت و تجزیه تحلیل دادهها با استفاده از نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با نرم افزار Excel صورت پذیرفت.

نتایج

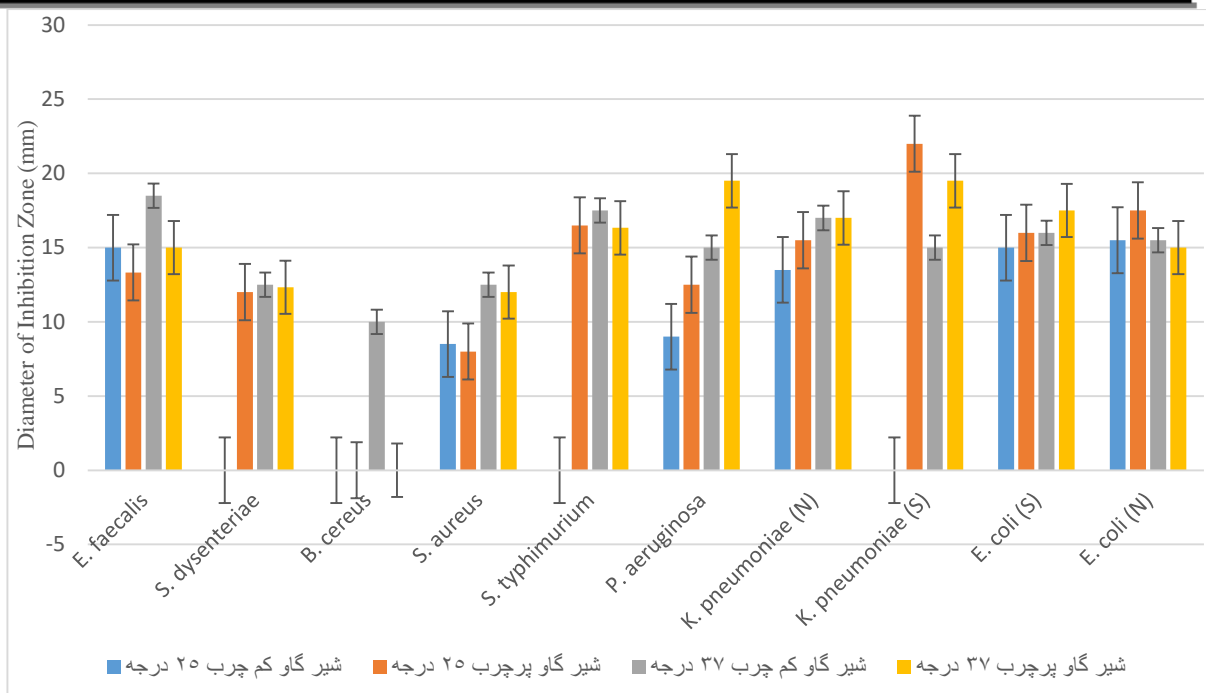
فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو علیه باکتری های مورد آزمون

جدول ۱. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتریهای مورد آزمون در نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو

سطح معنی داری	شیر گاو کم چرب ۲۵ درجه	شیر گاو پرچرب ۲۵ درجه	شیر گاو کم چرب ۳۷ درجه	شیر گاو پرچرب ۳۷ درجه	
۰/۴۳	۱۵±۱ ^{abB}	۱۳/۳۳±۰/۳۳ ^{dB}	۱۸/۵±۱/۵ ^{aA}	۱۵±۱ ^{bcB}	انتروکوکوس فکالیس
۰/۶۶	-	۱۲±۰ ^{dA}	۱۲/۵±۰/۵ ^{cdA}	۱۲/۳۳±۰/۳۳ ^{cA}	شیگلا دیسانتری
-	-	-	۱۰±۰ ^{dA}	-	باسیلوس سرئوس
۰/۰۱	۸/۵±۰/۵ ^{cb}	-	۱۲/۵±۰/۵ ^{cdA}	۱۲±۰/۵۷ ^{ca}	استافیلوکوکوس اورئوس
۰/۹۷	-	۱۶/۵±۰/۵ ^{bcA}	۱۷/۵±۰/۵ ^{abA}	۱۶/۳۳±۳/۲۱ ^{abA}	سالمونلا تیفی موریوم
۰/۰۰	۹±۰ ^{cD}	۱۲/۵±۰/۵ ^{dC}	۱۵±۱ ^{bcB}	۱۹/۵±۱/۵ ^{aA}	سودوموناس آئروژینوزا
۰/۰۲	-	۲۲±۱ ^{aA}	۱۵±۱ ^{bcB}	۱۹/۵±۰/۵ ^{aA}	کلبسیلا پنومونیه (سویه استاندارد)
۰/۰۹	۱۳/۵±۰/۵ ^{bb}	۱۵/۵±۰/۵ ^{cAB}	۱۷±۱ ^{abA}	۱۷±۱ ^{abA}	کلبسیلا پنومونیه (ایزوله بومی)
۰/۳۸	۱۵/۵±۰/۵ ^{aA}	۱۷/۵±۰/۵ ^{ba}	۱۵/۵±۰/۵ ^{ba}	۱۵±۱ ^{bcA}	اشریشیا کلی (ایزوله بومی)
۰/۱۳	۱۵±۰ ^{abA}	۱۶±۰ ^{bcA}	۱۶±۰ ^{abA}	۱۷/۵±۰/۵ ^{abA}	اشریشیا کلی (سویه استاندارد)
	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۳	سطح معنی داری

میانگین±انحراف معیار. حروف غیرمشابه کوچک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ($P \leq 0.05$).

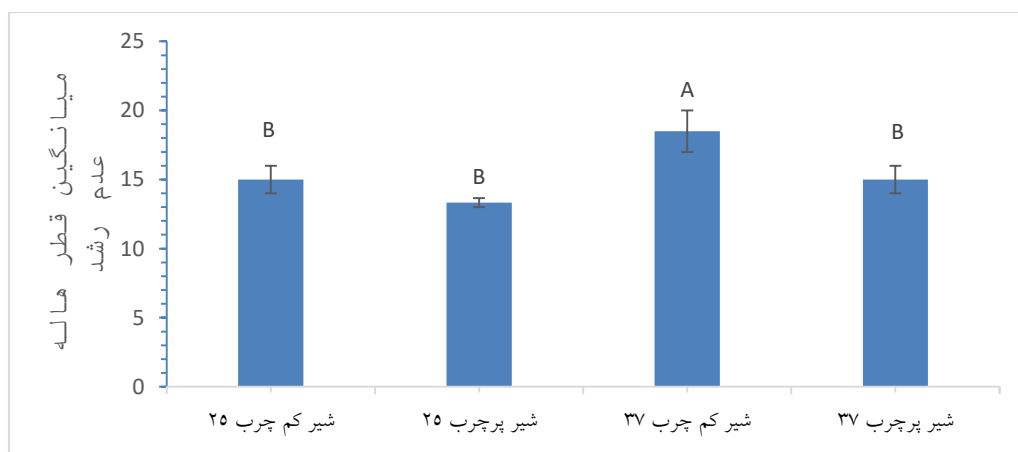
میانگین±انحراف معیار. حروف غیرمشابه بزرگ در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ($P \leq 0.05$).



شکل ۱. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتریهای مورد آزمون در نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو

بیشترین فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر علیه *انتروکوکوس فکالیس* و *شیگلا دیسانتری* مربوط به نمونه های کفیر تهیه شده با شیر کم چرب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۸/۵ و ۱۲/۵ میلیمتر بود (جدول ۱).

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود، نتایج مربوط به تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر باکتریهای *انتروکوکوس فکالیس* و *شیگلا دیسانتری* حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ($P > 0.05$). (شکل ۲ و ۳).



شکل ۲. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر باکتری *انتروکوکوس فکالیس* (حروف غیرمشابه در بالای ستون ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ($P \leq 0.05$)).

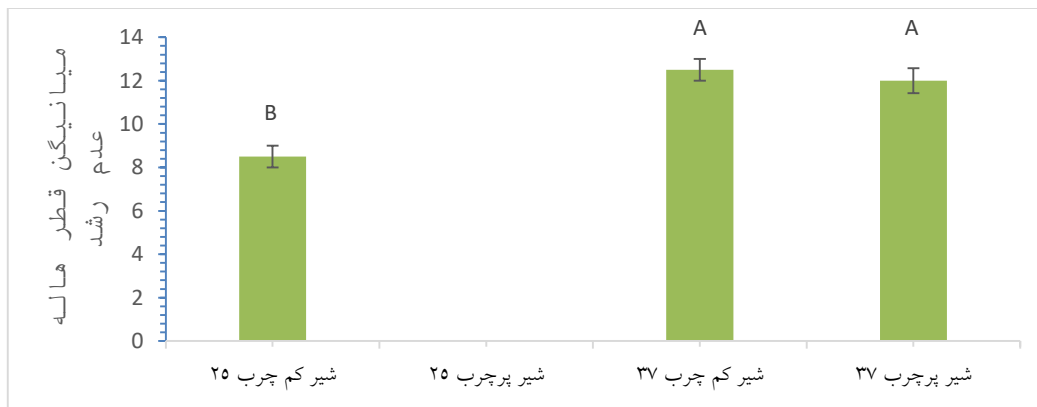


شکل ۳. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر باکتری شیگلا دیستتری

(حروف غیرمشابه در بالای ستون ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ($P \leq 0.05$)).

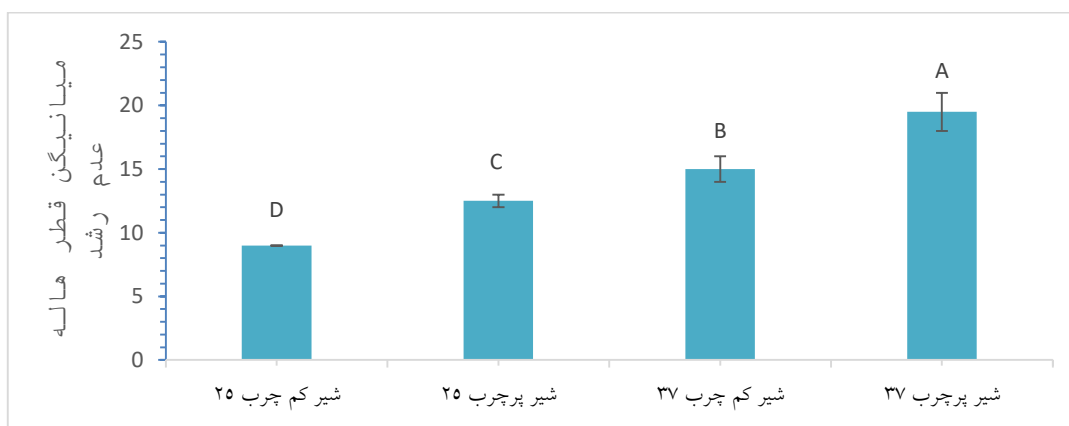
سانتیگراد فعالیت ضدباکتریایی بیشتری نسبت به نمونه های تهیه شده در ۲۵ درجه سانتیگراد نشان دادند که حاکی از تاثیر دمای تخمیر بر فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر می باشد (شکل ۴ و ۵).

یافته های مربوط به باکتریهای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها را نشان داد ($P < 0.05$) (جدول ۱). همانطور که مشاهده می شود نمونه های کفیر تهیه شده در ۳۷ درجه



شکل ۴. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

(حروف غیرمشابه در بالای ستون ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ($P \leq 0.05$)).

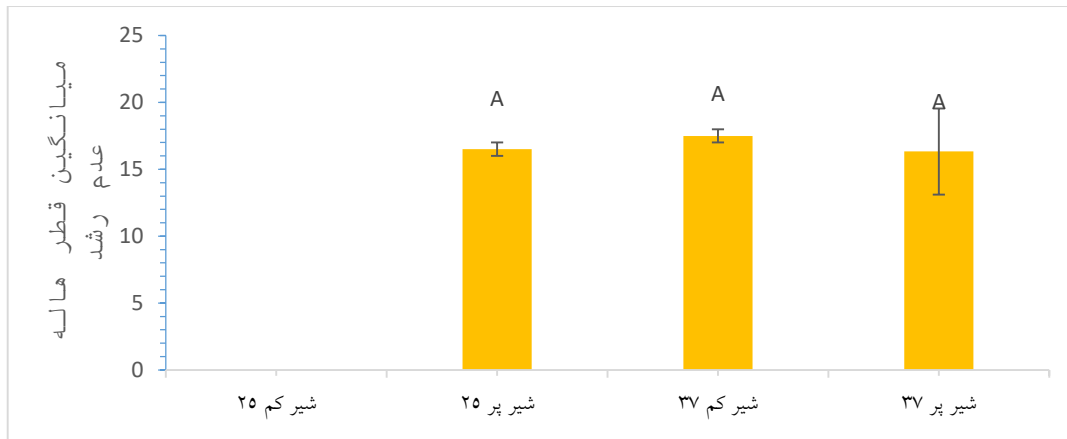


شکل ۵. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا

(حروف غیرمشابه در بالای ستون ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ($P \leq 0.05$)).

بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه این باکتری در نمونه کفیر تهیه شده با شیر کم چرب و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۷/۵ میلیمتر مشاهده شد (جدول ۱).

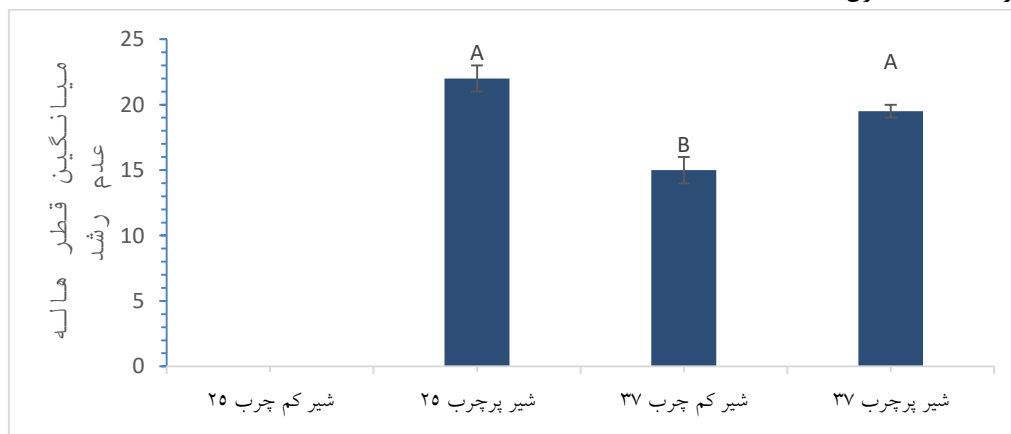
بر اساس نتایج جدول ۱، در خصوص باکتری سالمونلا تیفی موریوم، اختلاف معنی داری در بین تیمارهای حاضر مشاهده نشد ($P > 0/05$). نوع شیر و دمای تخمیر تاثیری بر فعالیت ضدباکتریایی علیه این باکتری گرم منفی نداشت.



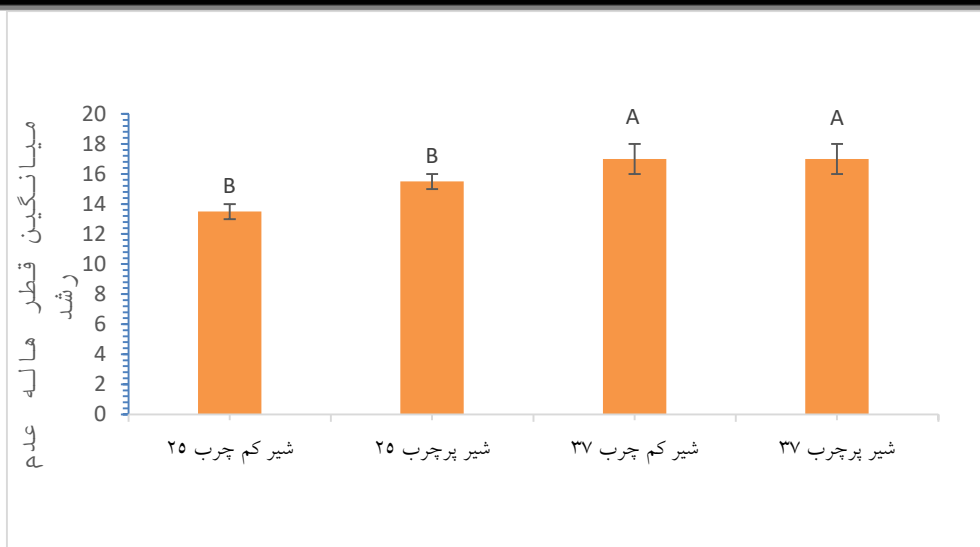
شکل ۶. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر باکتری سالمونلا تیفی موریوم (حروف غیرمشابه در بالای ستون‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد ($P \leq 0/05$)).

تاثیر معنادار دمای تخمیر در فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر تهیه شده علیه ایزوله بومی این باکتری مشهود است ($P < 0/05$). بطوریکه فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بطور معنی داری بیشتر از فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر تهیه شده در ۲۵ درجه سانتیگراد می باشد (شکل ۸).

نتایج مربوط به سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه بیانگر تاثیر نوع شیر بر فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر می‌باشد ($P < 0/05$) بطوریکه نمونه های تهیه شده با شیر پرچرب فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را نشان دادند. قطر هاله عدم رشد ۲۲ و ۱۹ میلیمتر به ترتیب در نمونه‌های تهیه شده در شیر پرچرب ۲۵ و ۳۷ درجه حاکی از این تاثیر قابل توجه است (جدول ۱).



شکل ۷. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه (حروف غیرمشابه در بالای ستون‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد ($P \leq 0/05$)).

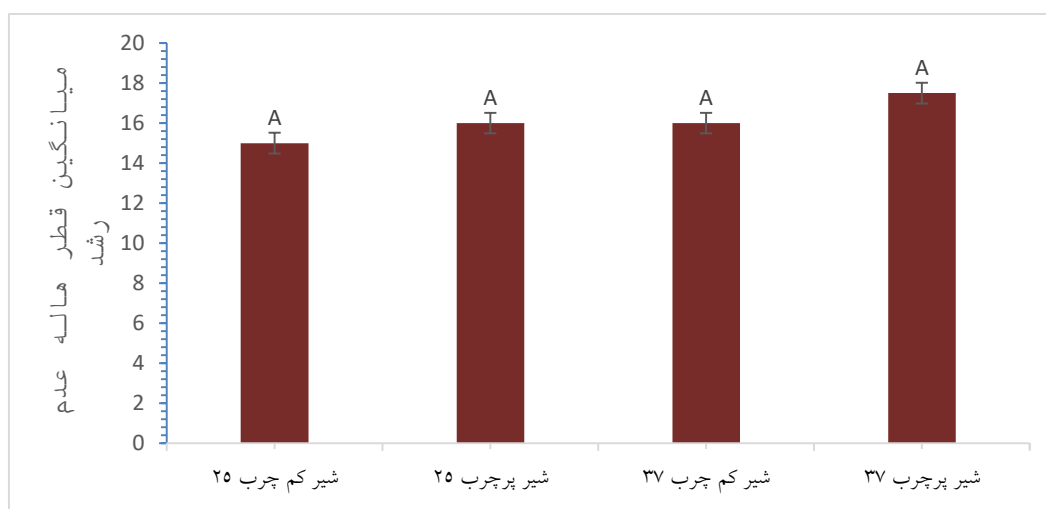


شکل ۸. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر ایزوله بومی کلبسیلا پنومونیه

(حروف غیرمشابه در بالای ستون‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد ($P \leq 0.05$)).

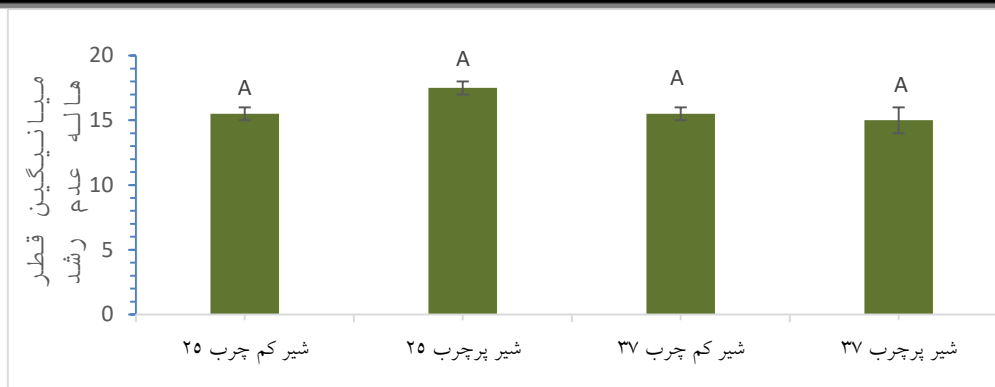
ایزوله بومی و استاندارد/شیریشیا کلی با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۷/۵ میلیمتر در نمونه های کفیر تهیه شده با شیر پرچرب در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد مشاهده شد (جدول ۱).

در خصوص باکتری/شیریشیا کلی اعم از ایزوله بومی و سویه استاندارد، اختلاف معناداری از نظر تاثیر نوع شیر و دمای تخمیر در بین تیمارها مشاهده نشد ($P > 0.05$). (شکل ۹ و ۱۰). با این وجود بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه



شکل ۹. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر سویه استاندارد/شیریشیا کلی

(حروف غیرمشابه در بالای ستون‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد ($P \leq 0.05$)).



شکل ۱۰. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر ایزوله بومی / شیرشیا کلی (حروف غیرمشابه در بالای ستون ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد) ($P \leq 0.05$).

همچنین در درمان و پیشگیری از عفونت های گوارشی، گاستروانتریت و عونت های واژینال موثرند (Farnworth, 2005; Sarkar, 2007).

از مکانیسم های فعالیت ضدباکتریایی عصاره های کفیر، می توان به pH اسیدی، در نتیجه تخمیر لاکتوز و افزایش محتوای اسیدهای آلی، همچون اسید لاکتیک، اسید استیک و ... توسط میکروارگانیسم های موجود در دانه های کفیر اشاره کرد.

اسید لاکتیک از طریق غشاء سیتوپلاسمی نفوذ می کند و باعث اسیدی شدن سیتوپلاسم و مهار فعالیت آنزیم ها می شود. در pH داخل سلولی بیشتر اسیدها منجر به تولید یون های هیدروژن می شوند که با اعمال متابولیکی مهم همچون فسفریلاسیون اکسیداتیو تداخل می کنند و باعث مهار گونه های هوازی می شوند. علاوه بر این، مشخص شد که اسید لاکتیک و استیک وقتی در عصاره کفیر با هم تولید می شوند، اثر مهاری هم افزایی عالی دارند و این اثر به تقویت اسید استیک در کاهش pH توسط اسید لاکتیک مربوط می شود (Farnworth., 2005).

تصور می شود که باکتریوسین ها با خراب کردن (corrupting) یون پتاسیم و ATP، پتانسیل غشاها را تغییر می دهند و باعث می شوند سلول ها نتوانند pH داخل سلول را متعادل کنند (Sezer and Guven, 2009).

میکروارگانیسم های موجود در دانه های کفیر به وسیله ماتریکس پروتئینی و پلی ساکاریدی به نام کفیران احاطه شده اند. کفیران یک گلوکولاکتان منشعب محلول در آب

در بین باکتریهای مورد آزمون، باسیلوس سرئوس به عنوان یک باکتری گرم مثبت عامل مسمومیت های غذایی، مقاومت قابل توجهی نسبت به عصاره نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو از خود نشان داد، بطوریکه فقط نمونه کفیر تهیه شده با شیر گاو کم چرب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۰ میلیمتر توانست از رشد این باکتری جلوگیری کند.

بحث

نتایج حاکی از فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو علیه باکتریهای مورد آزمون است. این فعالیت ضدباکتریایی را می توان ناشی از تولید اسید لاکتیک و دیگر ترکیبات ضد میکروبی تولید شده به وسیله باکتریهای اسید لاکتیک موجود در دانه های کفیر دانست (Kourkoutas, et al., 2007).

فعالیت ضد میکروبی عصاره کفیر در مطالعات متعددی گزارش شده است (Santos, et al., 2003; Silva, et al., 2009; Chifiriuc, et al., 2011; Garrote, et al., 2000). این مطالعات نشان می دهد که کفیر یک نوشیدنی ضد میکروبی است. و این فعالیت ضد میکروبی با تولید اسیدهای آلی، پپتیدها (باکتریوسین ها)، دی اکسید کربن، پراکسید هیدروژن، اتانول و دی استیل ارتباط دارد (Oliveira Leite, et al., 2013). علاوه بر این ترکیبات، اگزوپلی ساکارید تولید شده بوسیله دانه های کفیر به نام کفیران نیز دارای فعالیت های ضدباکتریایی می باشد (Wang, et al., 2008; Prado et al., 2015). این ترکیبات نه فقط در فعالیت ضد میکروبی علیه پاتوژن های گوارشی در طی تولید و نگهداری نوشیدنی تاثیر دارند،

با در نظر گرفتن اینکه بسیاری فعالیت ضدباکتریایی نوشیدنی کفیر را به ترکیب پلی ساکارییدی کفیران نسبت می دهند، Zajšek و Goršek نیز با هدف بررسی نیازمندی های رشد برای تولید کفیران از دانه های کفیر، شیر پرچرب گاو را به عنوان بهترین محیط برای تولید کفیران از دانه های کفیر، معرفی کردند (Zajšek and Goršek, 2011). Weschenfelder و همکاران فعالیت ضدباکتریایی بیشتر نمونه های کفیر تهیه شده در شیر پاستوریزه را نسبت به نمونه های کفیر تهیه شده با اسکیم میلک گزارش کردند (Weschenfelder et al., 2018).

این موضوع میتواند به وابسته بودن میکروارگانیسمهای موجود در دانه های کفیر به سوبستراهای دارای محتوای پروتئین و چربی بالاتر به منظور تولید ترکیبات با ماهیت ضد میکروبی مربوط شود. فعالیت های ضدباکتریایی نوشیدنی کفیر را به کفیران نسبت می دهند و تولید کفیران می تواند به طور چشم گیری با کنترل شرایط کشت افزایش یابد (Zajšek and Frengova et al., 2002; Goršek, 2011). فعالیت ضدباکتریایی بیشتر نمونه های کفیر تهیه شده در شیر پاستوریزه که چربی بیشتری از اسکیم میلک دارد نشان از تولید کفیران بیشتر در این نمونه هاست. فعالیت ضدباکتریایی بیشتر نمونه های کفیران استخراج شده از دانه های کفیر تخمیر شده در شیر پرچرب نسبت به شیر بدون چربی در مطالعه حاضر می تواند به وابسته بودن رشد دانه های کفیر به حضور و میزان سوبستراهای مورد نیاز برای رشد میکروارگانیسمهای موجود در دانه های کفیر از جمله پروتئین و لاکتوز صحت بگذارد.

همانطور که در نتایج اشاره شد، نمونه های کفیر تهیه شده در ۳۷ درجه سانتیگراد در مقایسه با نمونه های تهیه شده در ۲۵ درجه سانتیگراد، فعالیت ضدباکتریایی بیشتری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *ایزوله بومی کلبسیلا پنومونیه* نشان دادند که حاکی از تاثیر دمای تخمیر بر فعالیت ضدباکتریایی می باشد. همچنین بیشترین فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر علیه *انتروکوکوس فکالیس* و *شیگلا دیسانتری* مربوط به نمونه های کفیر تهیه شده با شیر کم چرب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به

است که از مقادیر یکسان D-گالاکتوز و D-گلوکز تشکیل شده است. تولید کفیران بیشتر توسط گونه های *لاکتوباسیلوس کفیرانوفاسینس* و *لاکتوباسیلوس کفیر* صورت می گیرد. فعالیت های ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدتوموری نوشیدنی کفیر را به کفیران نسبت می دهند. تولید کفیران میتواند به طور چشم گیری با کنترل شرایط کشت و اصلاح ترکیب واسطه، افزایش یابد، همچنین افزایش دانه های کفیر و تولید کفیران با اضافه کردن منابع معدنی تحریک می شود (Frengova, et al., 2002; Zajšek and Goršek., 2011).

به این واسطه تفاوت های موجود در فعالیت ضدباکتریایی نمونه های مختلف را می توان به تفاوت های موجود در شرایط تخمیر و نوع شیر مورد استفاده و البته حساسیت سویه های مختلف باکتریایی نسبت داد.

نقش های بیولوژیک این نوشیدنی تخمیری به ترکیبات موجود در محصول نهایی، میکروارگانیسمهای موجود در دانه های کفیر و ترکیبات حدواسط ناشی از متابولیسم آنها مربوط می شود. تفاوت در مقدار و نوع این میکروارگانیسمها و ترکیبات حدواسط با شرایط تخمیر از قبیل زمان، تخمیر، دما، درجه همزن، نوع شیر، نسبت تلقیح دانه ها همچنین pH و حساسیت های سویه های مختلف باکتریایی به آن ارتباط دارد (Ratray and O'Connell, 2011; Simova, et al., 2002; Tamime, 2006).

در مطالعه Ajam and Koohsari (۲۰۲۰) به تاثیر نوع شیر بر فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *شیگلا دیسانتری* اشاره شده است و بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد این باکتری ها، در نمونه های کفیر تهیه شده در شیر پرچرب دیده شد و نمونه های تخمیر شده در شیر پرچرب فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را علیه باکتری های مورد آزمون نشان دادند (Ajam and Koohsari., 2020).

مطالعات مختلف به نقش مثبت شیر پرچرب، خام و پاستوریزه در مقایسه با اسکیم میلک در استخراج کفیران از دانه های کفیر و فعالیت ضدباکتریایی عصاره کفیر اشاره داشته اند. فلورانس و همکاران (۲۰۱۲) شیر خام را به عنوان سوبسترای مناسب برای تهیه شیرهای تخمیری پیشنهاد دادند (Florence et al., 2012).

مطالعات مشابه به ماکزیمم رشد دانه های کفیر و تولید کفیران در دمای محیط (۳۰-۲۵ درجه سانتیگراد) هم از دانه های کفیر و هم از کشت لاکتوباسیلوس کفیر/نوفاسینس اشاره کرده اند (Pop, et al., 2014; Ismaiel, et al., 2011; Harta et al., 2003; Yokoi and Paraskevopoulou et al., 2003; Watanabe, 1992; Tanaguchi, et al., 2001; Yeesang, et al., 2007).

کاهش استخراج کفیران در دماهای تخمیر بالاتر در مطالعات مشابه گزارش شده است (Rimada and Abraham., 2001). این کاهش استخراج می تواند ناشی از حل شدن کفیران در دماهای بالا باشد (Rimada and Abraham., 2001).

با تمام این تفاسیر، رشد دانه های کفیر در محیط های کشت مختلف، به حضور و میزان سوبستراهای مورد نیاز برای رشد میکروارگانیسمهای موجود در دانه های کفیر از جمله پروتئین و لاکتوز وابسته است و مقادیر ترکیبات اصلی شیر می تواند به طور قابل توجهی بین گاوها، نژادهای مختلف و بین گاوهای همان نژاد و بسته به نوع خوراک متفاوت باشد (Bylund, 1995).

از طرفی تفاوت در نتایج مطالعه حاضر با دیگر مطالعات ممکن است به دلیل تفاوت در منشاء کفیر مورد آزمون باشد. تفاوت در فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر با منشاء مختلف در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Anderson and Gilliland, 1999; Pintado, et al., 1996).

تفاوتهای منطقه‌ای و شرایط تخمیر می تواند تنوع میکروبی در دانه‌های کفیر را تغییر دهد و تنوع میکروبی مسئول فعالیت‌های بیولوژیکی است (Kukhtyn et al., 2018). تنوع میکروبی مسئول فعالیت‌های بیولوژیکی و ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی کفیر است و بسته به منشأ منطقه‌ای دانه‌های کفیر، تنوع میکروبی آنها متفاوت است و بنابراین، فعالیت ضد باکتریایی آن نیز تغییر می کند (Altay, et al., 2013; Gao et al., 2012; Jianzhong, et al., 2009; Kabak and Dobson, 2011).

نتیجه‌گیری

ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۸/۵ و ۱۲/۵ میلی‌متر بود. در مطالعه تاثیر شرایط مختلف تخمیر بر فعالیت ضدباکتریایی شیر گاو تخمیر شده بوسیله دانه‌های کفیر علیه چهار باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، باسیلوس سرئوس و شیگلا دیسانتری نتایج مطالعه Ajam and Koohsari (۲۰۲۰) نشان داد که دمای تخمیر بر فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر علیه تمامی باکتری های مورد آزمون به استثناء شیگلا دیسانتری تاثیر معناداری داشت و با وجود اینکه بیشترین هاله عدم رشد باکتری‌های اشریشیا کلی، شیگلا دیسانتری و باسیلوس سرئوس در نمونه‌های کفیر تخمیر شده در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های تخمیر شده در ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده شد ولی با در نظر گرفتن تمامی فاکتورها و اثرات متقابل آنها، بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری های مورد آزمون در نمونه های کفیر تخمیر شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده گردید (Ajam and Koohsari., 2020).

مشاهده بیشترین فعالیت ضدباکتریایی در نمونه های تخمیر شده در ۲۵ درجه سانتیگراد، را می توان به وابسته بودن تولید ترکیبات با ماهیت ضد میکروبی به این محدوده دمایی نسبت داد. فعالیت‌های ضدباکتریایی نوشیدنی کفیر را به کفیران نسبت می دهند و تولید کفیران می تواند به طور چشم‌گیری با کنترل شرایط کشت افزایش یابد (Frengova, et. al., 2002; Zajšek and Goršek., 2011).

Zajšek و Goršek (۲۰۱۱) بهترین شرایط برای تولید کفیران از دانه های کفیر را تخمیر در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و همزدن در ۸۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در شیر پرچرب گاو معرفی کردند که با وقوع بیشترین فعالیت ضدباکتریایی در شرایط مذکور، همخوانی دارد. تولید ماکزیمم کفیران در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد شاید به دلیل این واقعیت است که میکروارگانیسمها با افزایش تولید کفیران خود را در برابر تأثیرات محیطی محافظت می کنند (Zajšek and Goršek., 2011). البته، کفیرهای سنتی نیز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت تهیه می شوند (Farnworth and Mainville, 2008).

در ۳۷ درجه سانتیگراد بود. در بین باکتریهای مورد آزمون، باسیلوس سرئوس مقاومت قابل ملاحظه‌ای نسبت به عصاره‌های نمونه‌های کفیر از خود نشان داد. با توجه به فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاو علیه باکتریهای بیماریزای مورد آزمون، استفاده از این نوشیدنی تخمیری به عنوان جایگزینی مناسبی برای نوشیدنی‌های گازدار با محتوای قند بالا توصیه می‌شود.

بطور کلی نمونه‌های کفیر تهیه شده در ۳۷ درجه سانتیگراد در مقایسه با نمونه‌های ۲۵ درجه سانتیگراد، فعالیت ضدباکتریایی بیشتری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *ایزوله بومی کلبسیلا پنومونیه* نشان دادند. همچنین بیشترین فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر علیه *انتروکوکوس فکالیس* و *شیگلا دیسانتری* مربوط به نمونه‌های تهیه شده با شیر کم‌چرب

منابع:

1. Ajam F. and Koohsari H. 2020. Effect of some fermentation conditions on antibacterial activity of fermented milk by kefir grains. *J. Food Process Preserv.* 44 (12): e14913.
2. Altay F., Karbancıoğlu-Güler F., Daskaya-Dikmen C. and Heperkan D. 2013. Are view on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *Int. J. Food Microbiol.* 167: 44-56.
3. Anderson J.W. and Gilliland S.E. 1999. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Nutr.* 18: 43-50.
4. Bylund G. 1995. Dairy Processing Handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, S-221 86 Lund.
5. Chifiriuc M.C., Cioaca A.B. and Lazar V. 2011. In vitro assay of the antimicrobial activity of kephir against bacterial and fungal strains. *Anaerobe* 17:433-435.
6. Farnworth E.R. 2005. Kefir. A complex probiotic. *Food Sci Tech Bull.* 2: 1-17.
7. Farnworth E.R. and Mainville I. 2008. Kefir - a fermented milk product. In: Handbook of fermented functional foods. 2nd ed. Farnworth, E. R. (ed) CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, pp. 89-127.
8. Florence A.C.R., Oliveira R.P.S., Silva R.C., Soares F.A.S.M., Gioielli L.A. and Oliveira M.N. 2012. Organic milk improves *Bifidobacterium lactis* counts and bioactive fatty acids contents in fermented milk. *Food Sci Technol.* 49: 89-95.
9. Frengova G.I., Simova E.D., Beshkova D.M. and Simov Z.I. 2002. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Zeitschrift für Naturforschung C.* 57: 805-810.
10. Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals; A review. *J Appl Bacteriol.* 66: 365-378.
11. Gao J., Gu F., Abdella N., Ruan H. and He G. 2012. Investigation on culturable microflora in Tibetan kefir grains from different areas of China. *J Food Sci.* 77:425-433.
12. Gao X. and Li B. 2016. Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: A review. *Cogent Food Agric.* 2: 1-10.
13. Garrote G.L., Abraham A.G. and De Antoni G.L. 2000. Inhibitory power of kefir: The role of organics acids. *J Food Prot.* 63:364-369.
14. Harta O., Iconomopoulou M., Bekatorou A., Nigam P., Kontominas M. and Koutinas A.A. 2004. Effect of various carbohydrate substrates on the production of kefir grains for use as a novel baking starter. *Food Chem.* 88:237-242.
15. Ismaiel A.A., Ghaly M.F. and El-Naggar A.K. 2011. Some physicochemical analyses of kefir produced under different fermentation conditions. *J Sci Ind Res.* 70:365-372.
16. Jianzhong Z., Xiaoli L., Hanhu J. and Mingsheng D. 2009. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiol.* 26:770-775.
17. Kabak, B., and Dobson, A. 2011. An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* 51:248-260.
18. Kourkoutas Y., Sipsas V., Papavasiliou G. and Koutinas A.A. 2007. An economic evaluation of freeze-dried kefir starter culture production using whey. *J Dairy Sci.* 90:2175-2180.
19. Kukhtyn M., Vichko O., Horyuk Y., Shved O., and Novikov V. 2018. Some

- probiotic characteristics of a fermented milk product based on microbiota of “Tibetan kefir grains” cultivated in Ukrainian household. *J. Food Sci Technol.* 55:252-257.
20. La Riviere J.W.M., Kooiman P. and Schmidt K. 1967. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch Mikrobiol.* 59:269-278.
21. Oliveira Leite A.M., Lemos Miguel M.A., Peixoto R.S., Rosado A.S., Silva J.T. and Paschoalin V.M.F. 2013. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Braz J Microbiol.* 44:341-349.
22. Paraskevopoulou A., Blekas G., Kiosseoglou V., Bekatorou A. and Kanellaki M. 2003. Functional properties of single cell protein produced by kefir microflora. *Food Res Int.* 36:431-438.
23. Pintado M.E., Lopes Da Silva J.A., Fernandes P.B., Malcata F.X. and Hogg T.A. 1996. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. *Int J Food Sci Technol.* 31:15-26.
24. Pop C., Apostu S., Salanta L., Rotar A.m., Sindic M., Mabon N. and Socaciu C. 2014. Influence of Different Growth Conditions on the Kefir Grains Production, used in the Kefiran Synthesis. *Bull UASVM Food Sci Tech.* 71:147-153.
25. Prado M.R., Blandon L.M., Vandenberghe L.P.S., Rodrigues C., Castro G.R., Thomaz-soccol V. and Soccol C.R. 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front Microbiol.* 6:1-10.
26. Rattray F.P. and O’Connell M.J. 2011. Fermented Milks Kefir. In: Fukay, J. W. (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2th ed). Academic Press, San Diego, USA, p.518-524.
27. Rimada P.S. and Abraham A.G. 2001. Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *J Dairy Res.* 68:653-661.
28. Robinson R.K. 1967. Therapeutic properties of fermented Milks. London Elsevier. 1991, 22-25.
29. Santos A., San Mauro M., Sanchez A., Torres J.M. and Marquina D. 2003. The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from Kefir. *Syst Appl Microbiol.* 26:434-437.
30. Sarkar S. 2007. Potential of kefir as a dietetic beverage - a review. *Br Food J.* 109:280-290.
31. Schwan R.F., Magalhães-Guedes K.T. and Dias D.R. 2014. KEFIR – Grain and Beverages: A Review. *Sci Agrar Parana.* 14:1-9.
32. Sezer C. and Guven A. 2009. Investigation of bacteriocin production capability of lactic acid bacteria isolated from foods. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 15:45-50.
33. Silva K.R., Rodrigues S.A., Filho L.X. and Lima A.S. 2009. Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. *Appl Biochem Biotechnol.* 152:316-325.
34. Simova E., Beshkova D., Angelov A., Hristozova T., Frengova G. and Spasov Z. 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J. Ind Microbiol Biotechnol.* 28:1-6.
35. Tamime A.Y. 2006. Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products. In: Tamime, AY (ed.), *Fermented Milk* Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, p.174-216.
36. Taniguchi M., Nomura M., Itaya T. and Tanaka T. 2001. Kefiran Production by *Lactobacillus kefiranoformis* under the Culture Conditions Established by Mimicking the Existence and Activities of Yeast in Kefir Grains. *Food Sci Technol Res.* 7:333-337.

-
37. Wang Y., Ahmed Z., Feng W., Li C. and Song S. 2008. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *Int J. Biol Macromol.* 43:283-288.
38. Weinstein M.P., Patel J.B., Burnham C.A., Campeau S., Conville P.S., Doern C., ... Zimmer B.L. 2018. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In *Clinical and laboratory standard institute (Vol. M07, 11th ed., pp. 15–35)*. Pennsylvania, USA. Wayne.
39. Weschenfelder, S., Paim, M.P., Gerhard, C., Carvalho, H.H.C. and Wiest, J.M. 2018. Antibacterial activity of different formulations of cheese and whey produced with kefir grains. *Rev. Cien. Agron.* 49, 443-449.
40. Yeesang C., Chanthachum S. and Cheirsilp B. 2007. Sago starch as a low-cost carbon source for exopolysaccharide production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. *World J. Microb Biot.* 24:1195-1201.
41. Yokoi H. and Watanabe T. 1992. Optimum culture conditions for production of kefiran by *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains. *J. Ferment Bio Eng.* 74:327-329.
42. Zajšek K. and Goršek A. 2011. Experimental assessment of the impact of cultivation conditions on kefiran production by the mixed microflora imbedded in kefir grains. *Chem Eng Trans.* 24:481-486.

Antibacterial activity of cow milk fermented by kefir grains against a number of pathogenic bacteria

Antibacterial activity of cow milk fermented ...

Hadi Koohsari^{1*}, Seyyede Sorayya Sajjadi², Araz Soltan Saedifar², Maryam Sadegh Shesh Poli³

¹ Associate Professor, Department of Microbiology, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran

² Graduated student, Department of Microbiology, Minudasht branch, Islamic Azad University, Minudasht, Iran

³ Graduated Ph.D of Molecular Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

*Corresponding author: hadikoohsari@yahoo.com

Abstract

Kefir beverage is one of the oldest fermented milk products, which is a natural probiotic and a complex of microbial symbiotic that is obtained from the fermentation of milk by kefir grains. The study aimed antibacterial activity of kefir samples prepared with cow milk against 10 pathogenic bacteria. Kefir grains were added to cow milk (Full-fat and low-fat) and fermentation was done at 25°C and 37°C. Grains were separated from kefir extract and the antibacterial activity of kefir extract was evaluated against 10 pathogenic bacteria by well method. Kefir samples prepared at 37°C compared to 25°C samples showed more antibacterial activity against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and native *K. pneumoniae* isolated. The most antibacterial activity of kefir samples against *E. faecalis* and *S. dysenteriae* was related to the samples prepared with low-fat milk at 37°C, respectively, with the average diameter of inhibition zone of 18.5 and 12.5 mm. The samples prepared with full-fat milk in 25°C and 37°C indicated more antibacterial activity with the diameter of inhibition zone of 22 and 19 mm against the standard *K. pneumoniae* strain, respectively. Significant difference was not observed about milk type and fermentation temperature effect on antibacterial activity against *E. coli*, both native isolate and standard strain and *S. typhimurium* (P<0.05). *B. cereus* showed significant resistance to kefir samples. Kefir prepared with cow milk is recommended due to significant antibacterial activity.

Key words: Kefir, Antibacterial activity, Cow milk, Pathogenic bacteria

Roster

Microbial and phytochemical attributes of kefir as a functional beverage enriched with red ginseng root extract

Erfan Golmohammadian , Marjan Nouri.....3

Evaluation of probiotic and antimicrobial properties of the predominant yeast isolated from barley sourdough

Shahryari, S. , Hajinia, F., Purabdolah, H., Ebrahimi, M. , Sadeghi, A.....17

Isolation and molecular identification of *Lactobacillus plantarum* bacteria from traditional dairy products

Kazemimiraki M , Moazamian E , Mokhtari MJ , Gholamzad M37

Antibacterial activity of cow milk fermented by kefir grains against a number of pathogenic bacteria

Hadi Koohsari, Seyyede Sorayya Sajjadi, Araz Soltan Saedifar, Maryam Sadegh Shesh Poli....54

