

(مقاله پژوهشی)

قابلیت تخمیر و فعالیت پروتئولیتیکی لاکتیک اسید باکتری‌ها در شیر و مقایسه فعالیت ضد قارچی لاکتیک اسید باکتری‌ها در شیر پس چرخ و MRS مایع

ماندانا محمودی^{*}، مرتضی خمیری^۱

۱-دانش آموخته دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۶

چکیده

در این تحقیق، قابلیت تخمیرشوندگی شیر توسط ۶ جدایه از لاکتیک اسید باکتری‌ها، فعالیت پروتئولیتیکی لاکتیک اسید باکتری‌ها در شیر با معرف اورتو فتال دی آلدئید (OPA) و خاصیت ضدقارچی لاکتیک اسید باکتری‌ها در MRS مایع و شیر پس چرخ در مقابل اسپرژیلوس فلاوس و کاندیدا آلیکسسمورد بررسی قرار گرفت. از لاکتوباسیلوس برویس KMJC1، لاکتوباسیلوس اسیدی پیسیس KMJC2، لاکتوباسیلوس کورواتوس KMJC3 و لاکتوباسیلوس پلانتاروم KMJC4 جدا شده از پنیر کوزه، لاکتوباسیلوس هلوتیکوس KMCH1 جدا شده از دوغ شتر (چال) و لاکتوکوکوس لاکتیس KMCM3 جدا شده از شیر شتر استفاده شد. نتایج نشان داد که در میان جدایه‌ها، لاکتوباسیلوس پلانتاروم KMJC4 پس از ۴۸ ساعت، لاکتوکوکوس لاکتیس KMCM3 پس از ۱۶ ساعت و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس KMCH1 پس از ۶۰ ساعت از قابلیت تخمیرشوندگی شیر برخوردار بودند. سنجش میزان پروتئولیز انجام شده در شیرهای تخمیری توسط جدایه‌های مذکور با استفاده از معرف OPA نشان داد فعالیت پروتئولیتیکی مربوط به جدایه‌های لاکتوباسیلوس هلوتیکوس KMCH1، لاکتوکوکوس لاکتیس KMCM3 و لاکتوباسیلوس پلانتاروم KMJC4 به ترتیب ۰/۳۴ mg/ml، ۰/۲۶ و ۰/۲۲ بود. در بررسی اثر ضدقارچی رومانند حاصل از فعالیت جدایه‌های لاکتیک اسید باکتری‌ها در مایع MRS اثر بازدارندگی بیشتری (MIC=۲۵ و ۵۰ mg/ml) نسبت به رومانند حاصل از کشت در شیر پس چرخ داشت، به طوری که MIC برای رومانند حاصل از شیر تخمیری مشاهده نشد. در پایانی توان نتیجه گرفت که لاکتوکوکوس لاکتیس KMCM3 در مقایسه با جدایه‌های دیگر در زمان کوتاه‌تری (۱۶ ساعت) توانست لاکتوز شیر را تخمیر کند. بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی توسط جدایه‌های مذکور در شیر، مربوط به جدایه لاکتوباسیلوس هلوتیکوس KMCH1 (۰/۳۴ mg/ml) بود. لاکتوباسیلوس پلانتاروم KMJC4 جدا شده از پنیر کوزه به‌عنوان بهترین جدایه برای تهیه رومانند حاصل از MRS مایع با خاصیت ضد قارچی بود.

واژه های کلیدی: فعالیت ضدقارچی، شیر تخمیری، فعالیت پروتئولیتیکی، لاکتیک اسید باکتری‌ها

۱- مقدمه

قارچ‌ها موجب فساد فرآورده‌های لبنی مانند انواع ماست، پنیر و شیرهای تخمیری می‌شوند. رشد کپک و مخمر در سطح این محصولات موجب ظاهری ناخوشایند، تغییر رنگ و بدطعمی (۲۴) و در بعضی موارد موجب تولید مایکوتوکسین می‌شود که نه تنها مصرف این محصولات را برای مصرف‌کنندگان نامناسب می‌سازد بلکه ضرر اقتصادی زیادی را برای صنایع لبنی به همراه دارد (۱۳). استفاده از روش‌های فیزیکی مانند حرارت، فشار بالا، اشعه، سونیکاسیون و پالس‌های الکتریکی برای مقابله با فساد قارچ‌ها در مواد غذایی موجب کاهش ارزش غذایی مواد غذایی می‌شود. از طرف دیگر افزودن قارچ‌کش‌ها به ماده غذایی به دلیل داشتن عوارض جانبی بر سلامتی انسان و محیط و نیز گسترش قارچ‌های مقاوم به قارچ‌کش توصیه نمی‌شود (۲). با توجه به افزایش نگرانی مصرف‌کنندگان در مورد ایمنی مواد غذایی ناشی از افزودنی‌ها، صنعت مواد غذایی به دنبال راهکاری برای جلوگیری از فساد قارچی و در نهایت افزایش طول عمر مواد غذایی است (۱۳ و ۹). در این میان استفاده از کشت‌های میکروبی به دلیل توانایی آن‌ها برای مهار رشد میکروارگانیسم‌های عامل فساد مواد غذایی رو به افزایش است. لاکتیک اسید باکتری‌ها رایج‌ترین گروه‌های میکروبی هستند که به دلیل نقش آن‌ها در تخمیر انواع مختلفی از مواد غذایی تخمیری و نیز پیشینه بی‌خطر بودن برای حفاظت فرآورده‌های لبنی انتخاب شده‌اند (۱۳). لاکتیک اسید باکتری‌ها از طریق رقابت برای مواد مغذی، تولید متابولیت‌های مهارشوندگی و کاهش pH در اثر تخمیر، فعالیت‌های ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند (۹). در این میان مطالعاتی در مورد خاصیت ضدقارچی این گروه از باکتری‌ها در محیط MRS مایع و شیر انجام شده است به عنوان مثال محققان خاصیت ضدکپکی رومانند حاصل از فعالیت لاکتیک اسید باکتری‌ها در آب پنیر تخمیر شده با دانه‌های کفیر در مقابل گونه‌های

آسپرژیلوس، پنی‌سیلیوم، تریکودرما و ریزوپوس (۱۹) و خاصیت ضد مخمری باکتری‌های لاکتیکی در دوغ (۱) را مشاهده کردند. همچنین خاصیت ضد قارچی رومانند حاصل از فعالیت باکتری‌های لاکتیکی در MRS مایع نیز گزارش شده است (۲۲ و ۲۵). محققان فعالیت ضدقارچی روماندها را به تولید اسیدهای آلی عمدتاً اسید لاکتیک نسبت داده‌اند. هر چند در سایر تحقیقات انجام شده، سینرژسم اسیدهای آلی، اسیدهای چرب، روترین، دی‌پتید حلقوی و پپتیدهای بزرگتر در مهار رشد قارچ گزارش شده است (۸). تراپچوا و همکاران (۲۰۱۴) نیز تأثیر ضدقارچی نژادهای لاکتوباسیلوس برویس در مهار رشد آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم را به تأثیر سینرژستی اسیدهای آلی و ترکیبات پروتئینی نسبت دادند (۲۸). اما تاکنون در مورد مقایسه دو محیط MRS مایع و شیر پس چرخ جهت تولید متابولیت‌هایی با خاصیت ضد قارچی اطلاعات اندکی در دست است. هدف از این تحقیق، بررسی قابلیت تخمیرشوندگی شیر توسط لاکتیک اسید باکتری‌ها و فعالیت پروتئولیتیکی آن‌ها در شیر و مقایسه دو محیط MRS مایع و شیر پس چرخ به عنوان محیطی برای تولید متابولیت‌هایی با خاصیت ضدقارچی توسط لاکتیک اسید باکتری‌ها بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- میکروارگانیسم‌های مورد استفاده و شرایط کشت

۲-۱-۱- جدایه‌های لاکتیکی

از لاکتیک اسید باکتری‌های ذخیره شده در بانک میکروبی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که قبلاً جداسازی و شناسایی مولکولی شدند استفاده گردید. جدایه‌های لاکتیکی در محیط MRS مایع (مرک، آلمان) استریل تلقیح شدند و تحت شرایط بی‌هوازی ایجاد شده به وسیله گاز پک در جار بی‌هوازی، دردمای °C ۳۷ به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های جمع آوری شده و باکتری‌های لاکتیک جدا شده از آنها

نام باکتری	منشأ جداسازی	محل جمع آوری	مدت نگهداری
لاکتوباسیلوس برویس ^۱ KMJC1	پنیر کوزه تهیه شده از مخلوط شیر گاوی و کمی شیر گوسفندی	بوکان	۶ ماهه
لاکتوباسیلوس اسیدی پیسیس ^۲ KMJC2	پنیر کوزه تهیه شده از مخلوط شیر گاوی و کمی شیر گوسفندی	بوکان	۶ ماهه
لاکتوباسیلوس کورواتوس ^۳ KMJC3	پنیر کوزه تهیه شده از مخلوط شیر گاوی و کمی شیر گوسفندی	بوکان	۳ ماهه
لاکتوباسیلوس پلانتاروم ^۴ KMJC4	پنیر کوزه تهیه شده از مخلوط شیر گاوی و کمی شیر گوسفندی	سلماس	۳ ماهه
لاکتوباسیلوس هلوتیکوس ^۵ KMCH1	دوغ شتر (چال)	بندر ترکمن	یک هفته
لاکتوکوکوس لکتیس ^۶ KMCM3	شیر شتر	آق‌قلا	تازه

1-Lactobacillus Brevis

2-Lactobacillus Acidipiscis

3-Lactobacillus Curvatus

4-Lactobacillus Plantarum

5-Lactobacillus Helveticus

6-Lactococcus Lactis

۲-۱-۲- قارچ‌ها

با استفاده از دستگاه فریزدرایر، خشک گردید و در فریزر 20°C - تا زمان انجام آزمایش‌ها نگهداری شد (۲۵). غلظت ماده خشک رومانند فاقد سلول 50mg/ml بود. در روز آزمایش رومانند خشک شده، در محیط کشت رقیق گردید.

۲-۱-۵- تولید شیر تخمیری و تهیه رومانند

ابتدا شیر بازساخته با افزودن ۱۲ گرم پودر شیر پس چرخ به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل تهیه گردید و در دمای 115°C به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. ۱۰ میلی‌لیتر از کشت فعال (انتهای فاز لگاریتمی) هر جدایه لاکتیکی در محیط MRS مایع سانتریفیوژ و رومانند دور ریخته شد. سپس رسوب باکتریایی با محلول نمک (۰/۸۵ درصد) استریل شستشو داده شد و مجدداً با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر از محلول نمک (۰/۸۵ درصد) استریل، سوسپانسیون تهیه گردید. دو درصد از سوسپانسیون هر جدایه لاکتیکی (1.09cfu/ml) به شیر بازساخته استریل تلقیح شد و در دمای 37°C تا رسیدن pH شیر به $4/6$ گرمخانه‌گذاری گردید. شیر تخمیری با سرعت 10000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4°C سانتریفیوژ شد. ابتدا رومانند شیر تخمیری برای حذف ذرات معلق با فیلتر ۲ میکرومتر از جنس فایبرگلاس (میلی‌پور، مرک، آلمان) و سپس برای اطمینان از حذف باکتری‌ها با فیلتر سرنگی $0/22$ میکرومتر (Jet Biofil، چین) فیلتر شد. رومانند به وسیله فریزدرایر خشک گردید و در دمای 20°C - نگهداری شد (۲۶). در این پژوهش دو کنترل در نظر گرفته شد. شیر استریل بدون انجام تخمیر و بدون افزودن اسید تحت عنوان کنترل اول و رومانند شیر اسیدی به عنوان شیر تخمیر نشده و غیر هیدرولیز شده، با افزودن اسید لاکتیکی به شیر بازساخته استریل تا رسیدن pH آن به $4/6$ تحت عنوان کنترل دوم استفاده شد. غلظت ماده خشک رومانند شیر تخمیری 60 mg/ml بود.

قارچ‌های مورد استفاده از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری-های صنعتی، واقع در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. از اسپرژیلوس فلاوس (PTCC 5004) و کاندیدا آلیکنس (PTCC / 5027 ATCC 10231) جهت انجام آزمون‌های ضد قارچی استفاده گردید. کپک در محیط PDB^۱ (مرک، آلمان) در دمای 28°C و مخمر در محیط YMB^۲ (گلوکز ۱۰ گرم، پپتون ۵ گرم، عصاره مخمر ۳ گرم، عصاره مالت ۳ گرم، آب مقطر ۱ لیتر) در دمای 25°C رشد داده شدند.

۲-۱-۳- ترسیم منحنی رشد باکتری

برای بردن به مدت زمان لازم برای رسیدن هر جدایه به انتهای فاز لگاریتمی، منحنی رشد هر جدایه لاکتیکی ترسیم شد. برای رسم منحنی رشد جدایه‌های لاکتیکی، یک کشت ۲۰ ساعته از آن‌ها تهیه شد و یک درصد از کشت فعال به محیط MRS مایع، تلقیح گردید. سپس برای تنظیم دانسیته نوری $0/05$ در طول موج 600nm ، تدریجاً محیط MRS مایع آن افزوده شد. باکتری‌ها در زمان صفر در دمای 37°C تحت شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. ثبت دانسیته نوری از زمان ورود به گرمخانه (زمان صفر) با فواصل زمانی دو تا ۳۲ ساعته انجام گرفت (۱۵).

۲-۱-۴- تهیه رومانند فاقد سلول (CFS)^۳

کشت مایع هر جدایه لاکتیکی در انتهای فاز لگاریتمی با $1/5 - 1/2 = \text{OD}_{600}$ ^۴، سانتریفیوژ شد (4000g)، به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای 4°C و رومانند فاقد سلول ($\text{pH} = 4/5$) جدا گردید. برای اطمینان از حذف کامل سلول‌های باکتریایی، رومانند از فیلتر سرنگی $0/22$ میکرومتر عبور داده شد. رومانند

- 1-Potato Dextrose Broth
- 2-Yeast Mold Broth
- 3-Cell Free Supernatant
- 4-Optical Density

۲-۱-۶- اندازه‌گیری فعالیت پروتئولیتیکی در شیرهای

تخمیر شده

تعیین فعالیت پروتئولیتیکی در شیرهای تخمیری، بر اساس واکنش گروه‌های آمین با معرف اورتو فتالدی آلدئید (OPA) بر اساس روش الفحری و همکاران (۲۰۱۶) با اندکی تغییرات انجام شد (۱۲). برای این منظور، ۲/۵ میلی‌لیتر از شیر تخمیر شده با ۵ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک ۵ درصد برای رسوب پروتئین‌های سنگین مخلوط گردید و پس از گذشت ۱۰ دقیقه در دمای محیط، با سرعت ۴۰۰۰ rpm در دمای ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و رومانند پس از صاف شدن با کاغذ صافی واتمن ۱ جهت ارزیابی خاصیت پروتئولیتیکی استفاده گردید. از شیر فاقد فرایند تخمیر که فقط گرمخانه‌گذاری شده بود نیز در کنار شیر اسیدی شده به عنوان کنترل استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان پروتئولیز، ۳ میلی‌لیتر از معرف OPA را با ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه شیر تخمیری مخلوط کرده، بعد از گذشت مدت زمان ۲ دقیقه جذب نمونه در طول موج ۳۴۰nm اندازه‌گیری شد. برای تعیین محتوای پپتیدی نیز منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف اسید آمینه سرین (۰/۵-۰/۰۰۲ mg/ml) تهیه شد.

۲-۲- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی

۲-۱-۲- فعالیت ضد کپکی رومانند جدایه‌های لاکتیک به

روش کدورت‌سنجی

بررسی فعالیت ضد کپکی رومانند جدایه‌های لاکتیک بر طبق روش توصیف شده توسط سنگمانی و هانگترکر (۲۰۱۴) با برخی تغییرات انجام شد (۲۵). به طور خلاصه، اسپوره‌های کپکی از کپک رشد یافته روی محیط PDA^۱ در توئین ۸۰

(۰/۱ درصد حجمی / حجمی) استریل سوسپانسیون شدند. شمارش اسپورها به وسیله لام نئوبار انجام شد. سپس سوسپانسیون اسپور در محیط PDB به صورت سریالی تا غلظت ۱۰۵ spore/ml رقیق گردید. ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور کپک و ۱۸۰ میکرولیتر از رومانند رقیق شده در محیط PDB به هر یک از چاهک‌ها در پلیت ۹۶ خانه ای افزوده شد (محدوده غلظت ۵۰-۱/۵۶ mg/ml برای رومانند فاقد سلول حاصل از MRS مایع و ۱-۶۰ mg/ml برای رومانند شیرهای تخمیری). سپس میکروپلیت در دمای ۲۸ °C گرمخانه‌گذاری گردید. پایین‌ترین غلظت رومانند که هیچ رشدی از کپک به صورت ماکروسکوپی مشاهده نشد به صورت مقادیر MIC^۲ (حداقل غلظت مهارشوندگی) بعد از ۴۸ ساعت گزارش گردید. مقادیر MFC^۳ (حداقل غلظت کشندگی) نیز با لکه‌گذاری ۱۰ میکرولیتر از چاهک MIC روی محیط PDA انجام شد. مشاهده هیچ رشدی روی پلیت به عنوان مقادیر MFC ثبت شد. کنترل‌ها شامل کنترل استریلیزاسیون، چاهک حاوی ۲۰۰ میکرولیتر PDB، کنترل منفی شامل چاهک حاوی ۲۰۰ میکرولیتر PDB حاوی رومانند، کنترل مثبت شامل چاهک حاوی ۱۸۰ میکرولیتر PDB و ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور کپک و چاهک حاوی ۱۸۰ میکرولیتر PDB حاوی آمفوتریسین (۴μg) (۲۳) و ۲۰ میکرولیتر اسپور کپک به عنوان چاهک کنترل عدم رشد در نظر گرفته شدند. درصد بازدارندگی رشد نیز به صورت [۱۰۰ × (چاهک کنترل / چاهک آزمایش) - ۱] محاسبه گردید.

2-Minimum Inhibitory Concentration

3-Minimum Fungicidal Concentration

1-Potato Dextrose Agar

۲-۲-۲- فعالیت ضد مخمری روماندهای جدایه‌های لاکتیکی

به روش کدورت‌سنجی

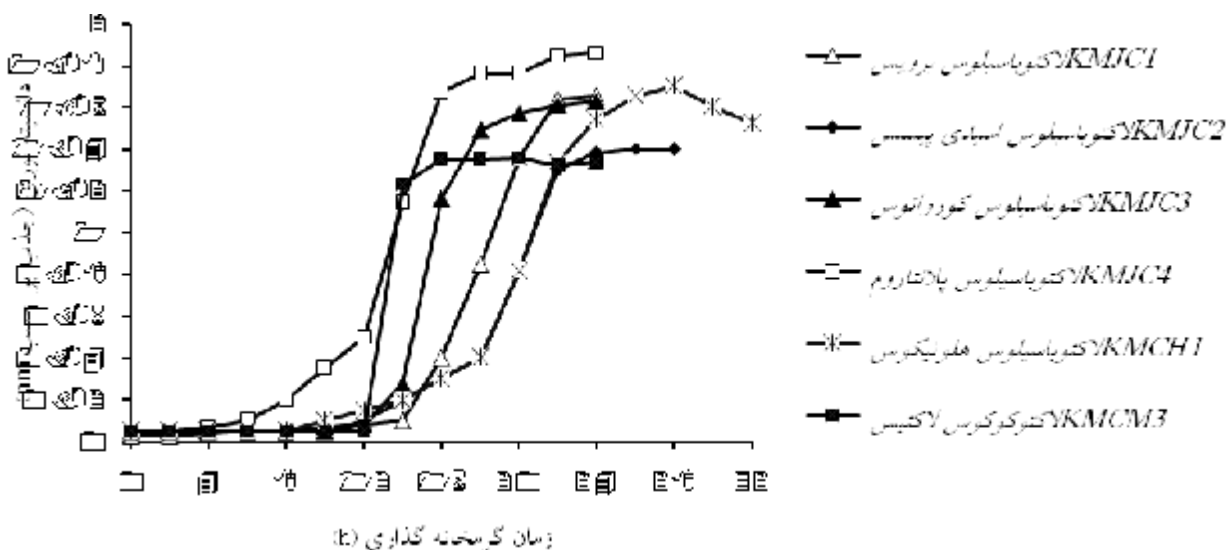
به منظور بررسی فعالیت ضد مخمری روماندهای جدایه‌های لاکتیکی از روش نیانزی و همکاران (۲۰۱۴) با برخی تغییرات استفاده شد (۲۲). کاندیدا آلیکس در محیط YMB در دمای °C ۲۵ رشد داده شد. سوسپانسیون در محیط YMB تا غلظت ۱۰۵ cfu/ml رقیق گردید. سرانجام، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمر و ۱۸۰ میکرولیتر از روماندهای رقیق شده در YMB به هر چاهک افزوده شد (محدوده غلظت روماندها همانند غلظت‌های تعیین شده برای آزمون ضد کپک بود). میکروپلیت در دمای °C ۲۵ به مدت ۷۲ ساعت‌گرمانه‌گذاری شد. مقادیر MIC و MFC بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گزارش شدند. مقادیر MFC با لکه‌گذاری ۱۰ میکرولیتر از چاهک MIC روی محیط YMA تعیین شد. کنترل‌ها همانند آزمون ضد کپکی انجام شد. درصد بازدارندگی رشد نیز به

صورت [۱۰۰ × (چاهک کنترل / چاهک آزمایش) - ۱] محاسبه گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مطالعه منحنی رشد

با رسم منحنی رشد جدایه‌های لاکتیکی (شکل ۱) مشخص شد که لاکتوباسیلوس برویس KMJC1، لاکتوباسیلوس اسیدی - پیسیس KMJC2، لاکتوباسیلوس کورواتوس KMJC3، لاکتوباسیلوس پلاناروم KMJC4، لاکتوکوکوس لاکتیس KMCM3 و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس KMCH1 به ترتیب پس از ۱۶، ۱۸، ۱۸، ۲۲، ۲۲ و ۲۸ ساعت با پایان فاز لگاریتمی وارد فاز سکون شدند. بر این اساس برای ادامه تحقیقات، روماندها فاقد سلول جدایه‌ها در انتهای فاز لگاریتمی تهیه شد. برای آماده‌سازی روماندهای شیر تخمیری، جدایه‌ها در انتهای فاز لگاریتمی به شیر پس چرخ بازساخته استریل تلقیح شدند.



شکل ۱- منحنی رشد جدایه‌های لاکتیکی منتخب

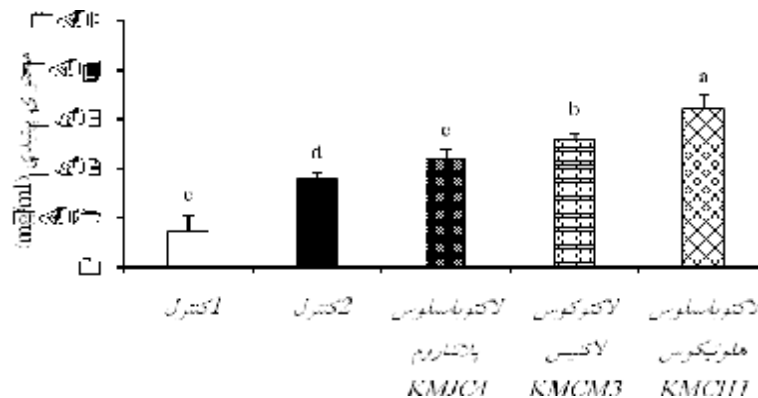
۲-۳- قابلیت تخمیر شون‌دگی شیر توسط جدایه‌های لاکتیکی

با توجه به اینکه معمولاً pH نهایی فرآورده‌های لبنی تخمیری ۴/۶ است (۲۱) بر این اساس، ابتدا قابلیت تخمیر شون‌دگی شیر توسط جدایه‌های لاکتیکی با تلقیح هر جدایه به شیر بازساخته به کمک اندازه‌گیری pH تعیین شد. هر جدایه که قادر بود pH شیر را به ۴/۶ کاهش دهد برای تولید شیر تخمیری انتخاب گردید. در میان ۶ جدایه لاکتیکی، فقط ۳ جدایه به نام لاکتوباسیلوس پلاتناروم KMJC4، لاکتوکوکوس لاکتیس KMCM3 و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس KMCH1 از قابلیت تخمیر شون‌دگی شیر برخوردار بودند. لاکتوباسیلوس پلاتناروم KMJC4 طی ۴۸ ساعت، لاکتوکوکوس لاکتیس KMCM3 طی ۱۶ ساعت و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس KMCH1 طی ۶۰ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ °C توانستند pH شیر را به ۴/۶ کاهش دهند. در میان جدایه‌ها، سرعت تخمیر شون‌دگی لاکتوکوکوس لاکتیس KMCM3 بیشتر از دو جدایه دیگر بود. سرعت مصرف لاکتوز و تولید اسید لاکتیک از جمله پارامترهایی هستند که به گونه و نژاد مرتبط هستند

(۱۰). از دلایل دیگر تفاوت لاکتیک اسید باکتری‌ها برای اسیدی کردن شیر می‌توان به توانایی خاص آن‌ها در تجزیه ترکیبات موجود در محیط مانند منابع کربن و نیتروژن و نیز به وجود یا عدم وجود سیستم انتقال مواد مغذی برای رشد در سیتوپلاسم مانند قندهای قابل تخمیر نسبت داد (۶ و ۳). همچنین احتمال می‌رود روند آهسته‌تر اسیدی شدن شیر تلقیح شده با لاکتوباسیلوس هلویتیکوس KMCH1 نشان‌دهنده یک مزیت تکنولوژیکی باشد. چون در این صورت کازئین‌ها در محلول باقی می‌مانند و انتشار پپتیدهای زیست فعال ناشی از فعالیت پروتئولیتیکی افزایش می‌یابد (۲۷).

۳-۳- بررسی پروتئولیز در شیرهای تخمیری

فعالیت پروتئولیتیکی، ویژگی مطلوب لاکتیک اسید باکتری‌های مورد استفاده در مواد غذایی فراسودمند است. این فعالیت می‌تواند شاخصی از حضور ترکیبات زیست فعال خصوصاً پپتیدهای کوچک با فواید سلامتی بخش در فرآورده‌های تخمیری باشد (۴). تخمیر شیر توسط لاکتیک اسید باکتری‌ها یکی از روش‌های اقتصادی و عملی برای تولید فرآورده‌های لبنی تخمیری غنی از پپتیدهای زیست فعال است (۱۶).



شکل ۲- فعالیت پروتئولیتیکی نمونه‌های شیر تخمیر شده و نمونه‌های کنترل. فعالیت پروتئولیتیکی به صورت محتوای پپتیدی بر حسب

mg/ml معادل اسید آمینه سرین

حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌ها در سطح ۵ درصد است ($P < 0.05$). نمونه کنترل ۱ و ۲ به ترتیب عبارتند از شیر بدون فرایند تخمیر یا افزودن اسید، شیر اسیدی شده با اسید لاکتیک.

همه نمونه‌های شیر تخمیری فعالیت پروتئولیتیکی بالاتری در مقایسه با نمونه‌های کنترل نشان دادند ($P < 0/05$). همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، شیر تخمیر شده با لاکتوباسیلوس هلویتیکوس KMCH1 بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی ($0/34 \text{ mg/ml}$) را نسبت به سایر نمونه‌ها مانند لاکتوکوکوس لاکتیس KMCM3 ($0/26 \text{ mg/ml}$) و لاکتوباسیلوس پلانتروم KMJC4 ($0/22 \text{ mg/ml}$) ($P < 0/05$) نشان داد. در این پژوهش، تفاوت گروه‌های آمین آزاد (که با معرف OPA مورد آزمون قرار گرفت) نمونه‌های شیر تخمیر شده در مقایسه با نمونه‌های کنترل نشان‌دهنده فعالیت پروتئولیتیکی جدایه‌های لاکتیکی و نیز توانایی آن‌ها برای تجزیه پروتئین‌های شیر و تولید پپتیدها است (۱۰). وسعت پروتئولیز متفاوت میان جدایه‌های لاکتیکی می‌تواند به دلیل تفاوت پروتئازها و پپتیدازهای آنها باشد (۱۸). الفحریو همکاران (۲۰۱۶) تفاوت معنی‌دار فعالیت پروتئولیتیکی شیرهای تخمیر شده با نژادهای مختلف لاکتوباسیلوس هلویتیکوس را به نژاد نسبت دادند (۱۲). در تحقیقات پیشین نیز فعالیت پروتئولیتیکی شیر تخمیر شده با لاکتوکوکوس لاکتیس و لاکتوباسیلوس پلانتروم گزارش شده است (۴ و ۵).

۳-۴- بررسی فعالیت ضدکپکی و ضدخمیری رومانند فاقد سلول و رومانند شیر تخمیری

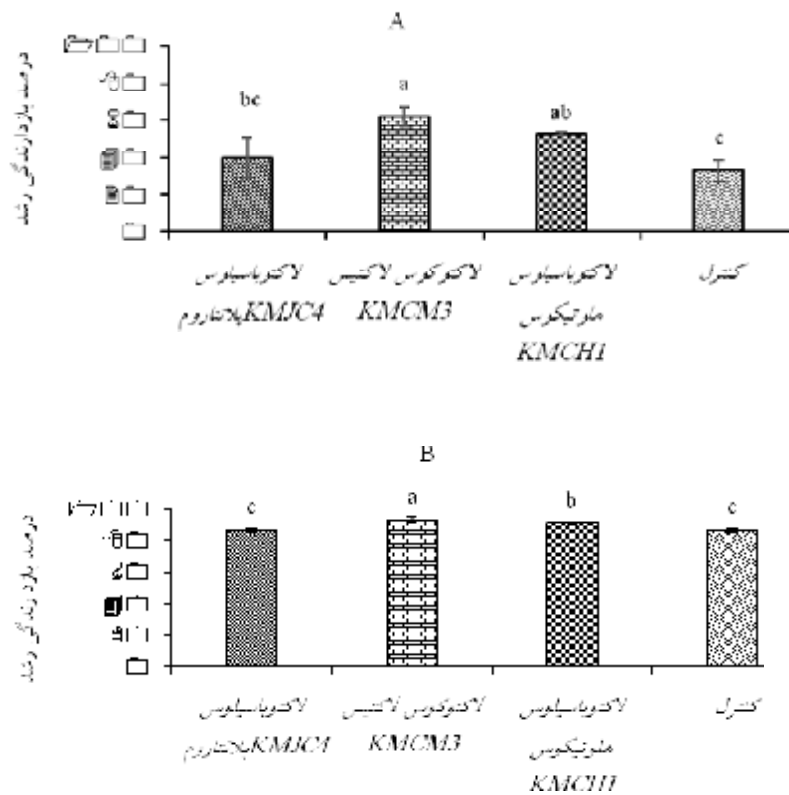
فعالیت ضد کپکی رومانند فاقد سلول در جدول ۲ و رومانند شیر اسیدی و شیر تخمیری در شکل (A) ۳ و فعالیت ضد

خمیری رومانند فاقد سلول در جدول ۳ و رومانند شیر اسیدی و شیر تخمیری در شکل (B) ۳ نشان داده شده است. مقادیر MIC رومانند فاقد سلول همه جدایه‌های لاکتیکی در مقابل کپک آسپرژیلوس فلاوس در محدوده غلظت ۲۵ mg/ml و ۵۰ بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای 28°C بود. در میان لاکتیک اسید باکتری‌ها، لاکتوباسیلوس پلانتروم KMJC4 با MFC برابر با ۵۰ mg/ml دارای قوی‌ترین اثر ضدکپکی در رومانند فاقد سلول بود. همه روماندهای فاقد سلول مقادیر MIC با غلظت ۵۰ mg/ml در مقابل کاندیدا آلیکنس بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای 25°C نشان دادند به غیر از رومانند لاکتوباسیلوس پلانتروم KMJC4 و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس KMCH1 که دارای مقادیر MIC با غلظت ۲۵ mg/ml بودند. بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری، همه روماندهای فاقد سلول به استثنای لاکتوباسیلوس برویس KMJC1 و لاکتوکوکوس لاکتیس KMCM3 فعالیت مهارشوندگی در مقابل کاندیدا آلیکنس را نشان دادند. بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، روماندهای لاکتوباسیلوس پلانتروم KMJC4 و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس KMCH1 دارای فعالیت ضد خمیری با مقدار MIC برابر با ۵۰ mg/ml بودند. در میان روماندها، فقط رومانند فاقد سلول لاکتوباسیلوس پلانتروم KMJC4 مقدار MFC برابر با ۵۰ mg/ml را تا ۷۲ ساعت حفظ کرد.

جدول ۲- فعالیت ضد کپکی رومانند فاقد سلول جدایه‌های لاکتیکی در مقابل آسپرژیلوس فلاوس

جدایه‌های لاکتیکی	لاکتوکوکوس لاکتیس	لاکتوباسیلوس هلویتیکوس	پلانتروم	لاکتوباسیلوس کورواتوس	لاکتوباسیلوس اسیدی پیسیس	لاکتوباسیلوس برویس
بازدارندگی / کشندگی	KMCM3	KMCH1	KMJC4	KMJC3	KMJC2	KMJC1
MIC (mg/ml) *	۵۰	۵۰	۲۵	۲۵	۵۰	۲۵
MFC (mg/ml) **	-	-	۵۰	-	-	-

Minimum Fungicidal Concentration***Minimum Inhibitory Concentration- بدون MFC (رشد نشان داد).



شکل ۳- فعالیت ضد کپک (A) و ضد مخمری (B) روماندهای تخمیری و شیر اسیدی (نمونه کنترل). حروف لاتین مشابه روی ستون‌ها نشانه عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها و حروف لاتین متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

جدول ۳- فعالیت ضد مخمری روماندهای فاقد سلول در مقابل کاندیدا آلبیکانس

MFC** (mg/ml)		MIC* (mg/ml)		زمان گرمخانه‌گذاری (ساعت)		لاکتیک اسید باکتری‌ها
۷۲	۴۸	۲۴	۷۲	۴۸	۲۴	
-	-	-	-	-	۵۰	لاکتوباسیلوس برویس KMJC1
-	-	۵۰	-	۵۰	۵۰	لاکتوباسیلوس اسیدی پیسیس KMJC2
-	۵۰	۵۰	-	۵۰	۵۰	لاکتوباسیلوس کورواتوس KMJC3
۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۲۵	لاکتوباسیلوس پلاتاروم KMJC4
-	-	-	۵۰	۵۰	۲۵	لاکتوباسیلوس هلویتیکوس KMCH1
-	-	-	-	-	۵۰	لاکتوکوکوس لاکتیس KMCM3

Minimum Fungicidal Concentration ** Minimum Inhibitory Concentration *

این در حالی است که MIC در مقابل آسپرژیلوس فلاوس و کاندیدا آلیکنس برای رومانند شیرهای تخمیری و شیر اسیدی (نمونه کنترل) مشاهده نشد. با این حال تفاوت معنی داری ($P < 0.05$) از لحاظ خاصیت ضد کپکی و ضد مخمری بین رومانند شیر تخمیر شده بالاکتوکوکوس لاکتیس KMCM3 و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس KMCH1 و رومانند شیر اسیدی در غلظت ۶۰ mg/ml مشاهده شد. تنها نمونه ای که با رومانند شیر اسیدی، تفاوت معنی داری نشان نداد رومانند شیر تخمیر شده بالاکتوباسیلوس پلانتاروم KMJC4 بود. نتایج خاصیت ضدقارچی شیرهای تخمیری حاکی از آن است که لاکتوکوکوس لاکتیس KMCM3 و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس KMCH1 به دلیل دارا بودن فعالیت پروتئولیتیکی بیشتر، احتمالاً پپتیدهای زیست فعال بیشتری در شیر تولید نموده که در کنار اسیدهای آلی تولید شده مانند اسید لاکتیک اثر ضد قارچی را تشدید کرد. در حالی که لاکتوباسیلوس پلانتاروم KMJC4 به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی کمتر نسبت به دو باکتری مذکور، فعالیت ضد قارچی رومانند شیر تخمیری حاصل از آن تفاوت معنی داری با شیر اسیدی نداشت ($P > 0.05$). در همین راستا دلانو همکاران (۲۰۱۳) اثرات ضد کپکی را وابسته به نژاد دانستند و اظهار داشتند که این ویژگی مربوط به قابلیت رشد نژادها در شیر و یا توانایی اسیدی کردن نیست بلکه مولکولهای ضد قارچی دیگری غیر از اسید استیک و اسید لاکتیک ممکن است مسئول خاصیت ضد قارچی باشند (۹) که نتایج ما نیز مؤید این مطلب است. گامبا و همکاران (۲۰۱۶) نیز طی تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که مهار قارچ ناشی از رومانند کفیر (نوشیدنی شیر تخمیری با دانه های کفیر) به واسطه اثر سینرژیستی اسیدهای آلی همراه با متابولیت های دیگر تولید شده توسط میکروارگانیسم های کفیر است (۱۴). جدایه های لاکتیک فعالیت های ضد کپکی و ضد مخمری متفاوتی را در MRS مایع نشان دادند. در میان آن ها، لاکتوباسیلوس پلانتاروم KMJC4 قوی ترین خاصیت

ضد کپکی و ضد مخمری را نشان داد که با نتایج لوز و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت دارد (۲۰). تفاوت خاصیت مهارشوندگی جدایه های لاکتیک می تواند مربوط به گونه یا نژاد باشد. در این راستا، لائو و لاین (۲۰۱۴) دریافتند که غلظت های اسید لاکتیک و اسید استیک تولید شده توسط ۵ نژاد از لاکتیک اسید باکتری ها، وابسته به نژاد بود و همه نژادها غلظت بالاتری از اسید لاکتیک را در مقایسه با اسید استیک تولید کردند (۱۷). محققان دیگر نیز ماهیت اجزای ضد کپکی لاکتوباسیلوس پلانتاروم در مقابل رشد و تولید آفلاتوکسین آسپرژیلوس فلاوس TISTR304 و آسپرژیلوس پارازیتیکوس TISTR3276 را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن ها نشان داد که فعالیت ضد کپکی رومانند فاقد سلول وابسته به pH بود و در میان اسیدهای آلی شناسایی شده، اسید لاکتیک عمده ترین اسید تولید شده توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم بود. آن ها همچنین با بهره گیری از SEM^۱ و TEM^۲ به بررسی تغییرات مورفولوژی کپک در تماس با رومانند پرداختند و مشاهده نمودند که رومانند فاقد سلول لاکتوباسیلوس پلانتاروم آسیب شدید بهبوداره سلولی و غشاء سیتوپلاسمی وارد کرد که منجر به از دست رفتن محتوای زیادی از سیتوپلاسم، تشکیل منافذ در غشاء و تخریب کامل اندامک های غشایی مانند هسته و میتوکندری شد (۲۵). همچنین بیان و همکاران (۲۰۱۶) فعالیت ضد کپکی لاکتوباسیلوس هلویتیکوس در مقابل گونه های پنی سیلیوم را به تولید اسید استیک و اسید لاکتیک نسبت دادند (۷). نیانزی و همکاران (۲۰۱۴) نیز طی تحقیقات خود نشان دادند که در میان نژادهای مختلف لاکتیک اسید باکتری های مورد مطالعه، عصاره متانولی نژادهای لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس کازنی و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس فعالیت ضد مخمری را بعد از ۶۰ ساعت حفظ کردند. آنها خاطر نشان کردند که این عصاره ها خاصیت مهارشوندگی در برابر

1-Scanning Electron Microscopy

2-Transmission Electron Microscopy

ضدقارچی بود. با مقایسه محیط آزمایشگاهی (MRS مایع) و محیط غذایی (شیر) می توان دریافت که محیط، نقش مهمی در تولید کمیت و نوع ترکیبات ضدقارچی تولید شده توسط لاکتیک اسید باکتری ها ایفا می کند. با مشاهده MIC و MFC لاکتیک اسید باکتری ها در محیط MRS مایع و عدم مشاهده این مقادیر در شیر می توان به اهمیت محیط فعالیت میکروارگانیسم ها در تولید متابولیت ها هم از لحاظ کمیت و هم از نظر تنوع ترکیبات تولید شده پی برد. امید است که تحقیقات آینده در زمینه فعالیت ضد میکروبی، روی مدل های غذایی انجام شود تا نتایج حاصل از آن در مقیاس بزرگ قابل استفاده باشد.

۵- منابع

۱. خمیری، م.، عیسی زاده رازلیقی، س.، نصرالله زاده، ا. ۱۳۹۵. بررسی فعالیت ضد مخمری لاکتوباسیلوس بر ویسو اتروکوکوس فاسیوم جدا شده از چال (شیر تخمیری شتر) بر مخمرهای عامل فساد مواد غذایی در دوغ. مهندسی بیوسیستم ایران. جلد ۴۷، شماره ۴، ۶۴۹-۶۴۳.

2. Adebayo, C.O. and Aderiye, B.I. 2011. Suspected mode of antimycotic action of brevicin SG1 against *Candida albicans* and *Penicillium citrinum*. *Food Control*, 22: 1814-1820.
3. Albenzio, M., Corbo, M.R., Rehman, U.S., Fox, P.F., De Angelis, M., Corsetti, A. and et al. 2001. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *International Journal of Food Microbiology*, 67: 35-48.
4. Ayyash, M., Al-Dhaheri, A.S., Al Mahadin, S., Kizhakkayil, J. and Abushelaibi, A. 2018a. In vitro investigation of anticancer, antihypertensive, antidiabetic, and antioxidant activities of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 101: 1-12.
5. Ayyash, M., Al-Nuaimi, A.K., Al-Mahadin, S. and Liu, S.Q. 2018b. In vitro investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α -amylase and α -glucosidase inhibition, and

کاندید/ آلیکنس دارند و از قابلیت کشندگی مخمر برخوردار نیستند (۲۲) که با نتایج ما مطابقت دارد. با نگاهی کلی از مقایسه اثر مهارشوندگی رومانند حاصل از کشت جدایه های لاکتیک در دو محیط MRS مایع شیر پس چرخ می توان دریافت که اثر ضد کپکی و ضد مخمری رومانند فاقد سلول بیشتر از شیر تخمیری بود. این تفاوت احتمالاً به دلیل تأثیر محیط کشت روی متابولیسم باکتریایی است که به نوبه خود می تواند موجب مقادیر متفاوت متابولیت های تولید شده باشد (۱۳). به عنوان مثال، بر طبق نتایج پژوهش فرناندز و همکاران (۲۰۱۷)، غلظت اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک، ۳- فنیل اسید لاکتیک و ۴- هیدروکسی فنیل اسید لاکتیک تولید شده توسط لاکتوباسیلوس پلان تاروم در محیط MRS مایع به طور معنی داری ($P < 0.05$) بیشتر از شیر پس چرخ بود (۱۳). همچنین وجود برخی از اجزای شیر یا متابولیت های تولید شده به وسیله تخمیر اسید لاکتیک ممکن است به عنوان فاکتور رشد قارچ عمل کنند (۲۸).

۴- نتیجه گیری

با توجه به نتایج پژوهش حاضر می توان دریافت که لزوماً همه لاکتیک اسید باکتری ها قادر به تخمیر لاکتوز و تولید اسید نیستند، حتی سرعت تخمیر لاکتوز و تولید اسید در میان لاکتیک اسید باکتری ها یکسان نبوده و به گونه و نژاد باکتری وابسته است که بر طبق تحقیق حاضر لاکتوکوکوس لاکتیس KMCM3 در مقایسه با جدایه های دیگر در زمان کوتاه تری (۱۶ ساعت) توانست شیر را تخمیر کند. همچنین فعالیت پروتئولیتیکی در بین گونه ها و نژادهای مختلف لاکتیک اسید باکتری ها یکسان نیست به طوری که در تحقیق ما نیز به اثبات رسیده است. در میان لاکتیک اسید باکتری های منتخب، لاکتوباسیلوس هلوتیکوس KMCH1 بالاترین فعالیت پروتئولیتیکی (0.34 mg/ml) را در شیر نشان داده است. در میان لاکتیک اسید باکتری ها، رومانند فاقد سلول لاکتوباسیلوس پلان تاروم KMJC4 دارای قوی ترین خاصیت

Fusarium graminearum. *Journal of Dairy Research*, 83(2): 249-255.

15. Gulahmadov, S.G., Abdullaeva, N.F., Guseinova, N.F., Kuliev, A.A., Ivanova, I.V. and Dalgalarondo, M. 2009. Isolation and characterization of bacteriocin-like inhibitory substances from lactic acid bacteria isolated from Azerbaijan cheeses. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45(3): 266-271.

16. Hayes, M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Stanton, C. 2007. Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions, 4: 435-449.

17. Lau, A.S.Y. and Liong, M.T. 2014. Lactic acid bacteria and bifidobacteria-inhibited *Staphylococcus epidermidis*. *Wounds*, 26: 121-131.

18. Liu, M., Bayjanov, J.R., Renckens, B., Nauta, A. and Siezen, R.J. 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*, 11: 36.

19. Londero, A., León, A., Diosma, G., De Antoni, G., Abraham, A. and Garrote, G. 2014. Fermented Whey as Poultry Feed Additive to Prevent Fungal Contamination. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94: 3189-3194.

20. Luz, C., Saladino, F., Luciano, F.B., Mañes, J. and Meca, G. 2017. In vitro antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. *LWT-Food Science and Technology*, 81: 128-135.

21. Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16: 189-199.

22. Nyanzi, R., Awouafack, M.D., Steenkamp, P., Jooste, P.J. and Eloff, J.N. 2014. Anticandidal activity of cell extracts from 13 probiotic *Lactobacillus* strains and characterisation of lactic acid and a novel fatty acid derivative from one strain. *Food Chemistry*, 164: 470-475.

23. Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C. and Salgueiro, L. 2009. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species.

antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Food Chemistry*, 239: 588-597.

6. Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjema, B., Henni, D.E., Tornadijo, M.E. and Kihal, M. 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat's milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 2: 579-588.

7. Bian, X., Muhammad, Z., Etareri Evivie, S., Luo, G.W., Xu, M. and Huo, G.C. 2016. Screening of antifungal potentials of *Lactobacillus helveticus* KLDS 1.8701 against spoilage microorganism and their effects on physicochemical properties and shelf life of fermented soybean milk during preservation. *Food Control*, 66: 183-189.

8. Crowley, S., Mahony, J. and van Sinderen, D. 2013. Current perspectives on antifungallactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 33: 93-109.

9. Delavenne, E., Ismail, R., Pawtowski, A., Mounier, J., Barbier, G. and Le Blay, G. 2013. Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control*, 30: 206-213.

10. Donkor, O.N., Henriksson, A., Singh, T.K., Vasiljevic, T. and Shah, N.P. 2007. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17: 1321-1331.

11. Elfahri, K., Donkor, O. and Vasiljevic, T. 2014. Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound protease to release physiologically active peptides from milk proteins. *International Dairy Journal*, 38: 37-46.

12. Elfahri, K.R., Vasiljevic, T., Yeager, T. and Donkor, O.N. 2016. Anti-colon cancer and antioxidant activities of bovine skim milk fermented by selected *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of dairy science*, 99: 1-10.

13. Fernandez, B., Vimont, A., Desfossés-Foucault, E., Daga, M., Arora, G. and Fliss, I. 2017. Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. *Food Control*, 78: 350-356.

14. Gamba, R.R., De Antoni, G. and León Peláez, A. 2016. Whey permeate fermented with kefirgrains shows antifungal effect against

- helveticus* and *Lactobacillus acidophilus* against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. M.S. Thesis, Guelph, Ontario, Canada.
27. Solieri, L., Rutella, G.S. and Tagliazucchi, D. 2015. Impact of non-starter lactobacilli on release of peptides with angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities during bovine milk fermentation. *Food Microbiology*, 51: 108-116.
28. Tropcheva, R., Nikolova, D., Evstatieva, Y. and Danova, S. 2014. Antifungal activity and identification of Lactobacilli, isolated from traditional dairy product "katak". *Anaerobe*, 28: 78-84.
- Journal of Medical Microbiology*, 58: 1454-1462.
24. Rowe, M. and Donaghy, J. 2011. Microbiological aspects of dairy ingredients. In *Dairy ingredients for food processing* (pp. 59-101). Wiley-Blackwell.
25. Sangmanee, P. and Hongpattarakere, T. 2014. Inhibitory of multiple antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 40: 224-233.
26. Sharma, S. 2014. Antivirulence activities of Bioactive Peptides produced by *Lactobacillus*

(Original Research Paper)

Fermentation Capability And Proteolytic Activity of Lactic Acid Bacteria in Milk and Comparison of Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria in Skim Milk and MRS

Mandana Mahmoudi^{1*}, Morteza Khomeiri¹

1-Ph.D Graduated of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Received: 15/04/2019

Accepted:08/07/2019

Abstract

In this study, milk fermentation capability by 6 isolates of lactic acid bacteria, proteolytic activity of lactic acid bacteria in milk by ortho-phthaldialdehyde (OPA) reagent and antifungal property of lactic acid bacteria in MRS broth and skim milk against *Aspergillus flavus* and *Candida albicans* were studied. *L. brevis* KMJC1, *L. acidiphiscis* KMJC2, *L. curvatus* KMJC3 and *L. plantarum* KMJC4 isolated from Jug cheese, *L. helveticus* KMCH1 isolated from camel doogh (Chal) and *Lac. lactis* KMCM3 isolated from camel milk were used. The results showed that among the isolates, *L. plantarum* KMJC4 after 48 h, *Lac. lactis* KMCM3 after 16 h and *L. helveticus* KMCH1 after 60 h had milk fermentation capability. The measurement of proteolysis rate performed in fermented milk by mentioned isolates using OPA reagent indicated that the proteolytic activity of *L. helveticus* KMCH1, *Lac. lactis* KMCM3 and *L. plantarum* KMJC4 were 0.34, 0.26 and 0.22 mg/ml, respectively. In study of the antifungal effect of supernatant resulting from the activity of lactic isolates, it was found that supernatant obtained from culture in MRS broth had a more inhibitory effect (MIC= 25 and 50 mg/ml) than the supernatant obtained from the culture in the skim milk, as the MIC was not observed for the supernatant obtained from fermented milk. In the end, it can be concluded that *Lac. lactis* KMCM3 was able to ferment lactose in milk in comparison with other isolates in shorter time (16 h). The highest proteolytic activity of the isolates in milk was related to the isolate of *L. helveticus* KMCH1 (0.34 mg/ml). *L. plantarum* KMJC4 isolated from Jug cheese was as the best isolate for the preparation of supernatant resulting from MRS broth with the antifungal property.

Keywords: Antifungal Activity, Fermented Milk, Proteolytic Activity, Lactic Acid Bacteria

*Corresponding Author: m.mahmoudi62@yahoo.com