Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Investigation of antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from sorghum, corn and barley sour doughs against *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum* and *Rhizopus coriniformis* molds

Barat Ali Zarei Yam

PhD student in Food Science and Technology - Food Microbiology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: alizarei1662@gmail.com

Morteza Khomeiri

Corresponding author. Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: mkhomeiri@gau.ac.ir, Tell: +989111777143

Ali Moayedi

Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: amoayedi@gau.ac.ir

Ahad Yamchi

Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: yamchi@gau.ac.ir

---

Abstract

Objective: In recent years, the use of biological methods to control the activity of molds with the help of lactic acid bacteria and their metabolites has received much attention. The aim of this study was to isolate and molecularly identify of lactic acid bacteria with antifungal ability from corn, sorghum and barley sour doughs.

Methods: The anti-fungal properties of 68 cell bacterial isolates, bacterial supernatant and autoclaved cells were investigated on *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum* and *Rhizopus coriniformis* molds. Also, the anti-mold properties of the supernatant treated with pepsin and proteinase K enzymes were tested.

Results: The results showed that the percentage of inhibition of live bacterial cells on the molds of *A. flavus*, *P. expansum* and *R. coriniformis* was between 0-16, -0.33 and -0.56 percent,

respectively. The lowest inhibitory effect of live bacterial cells was observed on *R. coriniformis* and the highest inhibitory effect was observed on *P. expansum*. The supernatants of most isolates had an inhibitory effect on *R. coriniformis* in the range of 0-30 percent, while this inhibition of growth on *P. expansum* mold was in the range of 100-90 percent, indicating that this mold is sensitive to the supernatant of most isolates. Regarding the inhibitory effect on *P. expansum* and *R. coriniformis*, the highest frequency of isolates was in the range of 91-100 percent, which indicated that these two molds were more sensitive to the heated cell of the most bacterial isolates. Based on the results, finally three isolates were selected as superior isolates, all of which were identified as *Lactobacillus plantarum*. The supernatants from these three bacterial isolates when treated with pepsin, inhibited the growth of *A. flavus* only and had no inhibitory effect on the other two molds.

Conclusion: The results of this study showed that it is possible to use *L. plantarum* and its supernatant for control of mold growth.
Keywords: Lactic acid bacteria, Pepsin, Heated cell, Cell-free supernatant, Anti-fungal activity.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Zarei Yam BA, Khomeiri M, Moayedi A, Yamchi A (2022). Investigation of antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from sorghum, corn and barley sour doughs against *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum* and *Rhizopus coriniformis* molds. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (1), 47-66.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (1), 47-66. DOI: 10.22103/jab.2021.17323.1302

Received: November 21, 2021. Accepted: December 20, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

بررسی فعالیت ضدکپکی باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از خمیرهای سورگوم، ذرت و جو علیه کپک‌های *Aspergillus flavus*، *Penicillium expansum* و *Rhizopus coriniformis*

براتعلی زارعی یام

دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذائی- میکروبیولوژی مواد غذائی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: alizarei1662@gmail.com

مرتضی خمیری

*نویسنده مسئول: استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه mkhomeiri@gau.ac.ir، شماره تماس ۹۸۹۱۱۱۷۷۷۱۴۳

علی مویدی

استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: amoayedi@gau.ac.ir

احد یامچی

استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: yamchi@gau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۸

چکیده

هدف: در سالیان اخیر استفاده از باکتری‌های لاکتیک اسید و متابولیت‌های آنها برای کنترل فعالیت کپک‌ها مورد توجه زیادی قرار گرفته ا ست. هدف از این تحقیق، جدا سازی و شنا سایی مولکولی باکتری‌های لاکتیک ا سید با قابلیت ضدقارچی از خمیر ذرت، سورگوم و جو می‌باشد.

روش: خصوصیات ضدکپکی ۶۸ جدایه باکتری، روماند باکتریایی و سلول حرارت دیده‌شان با اتوکلاو بر روی کپک‌های *Aspergillus flavus*، *Penicillium expansum* و *Rhizopus coriniformis* بررسی شد. همچنین خصوصیات ضدکپکی روماند تیمار شده با آنزیم‌های پپسین و پروتئیناز K مورد آزمون قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که درصد بازدارندگی سلول‌های زنده باکتریایی بر روی کپک‌های *A. flavus*، *P. expansum* و *R. coriniformis* به ترتیب بین ۱۶- ۰، ۳۳/۶۴ - ۰ و ۱۱/۵۶ - ۰ درصد بود. کمترین اثر ممانعت کنندگی سلول‌های زنده باکتریایی بر روی کپک *R. coriniformis* و بیشترین ممانعت‌کنندگی بر کپک *P. expansum* مشاهده شد. روماند بیشتر جدایه‌ها در محدوده فراوانی بین ۰ تا ۳۰ درصد بر روی کپک *R. coriniformis* اثر ممانعت‌کنندگی داشتند درحالی که این ممانعت از رشد بر روی کپک *P. expansum* در محدوده فراوانی ۱۰۰-۹۰ در صد بود که نشان از حساس بودن این کپک به روماند اکثر جدایه‌ها داشت. در مورد اثر مهارکنندگی بر کپک‌های *P. expansum* و *R. coriniformis*، بیشترین فراوانی جدایه‌ها در محدوده ۱۰۰-۹۱ درصد بود که حاکی از حساس‌تر بودن این دو گونه کپکی به سلول حرارت دیده اکثر جدایه‌های باکتریایی بود. در نهایت سه جدایه به عنوان جدایه‌های برتر انتخاب شدند که هر سه به عنوان *Lactobacillus plantarum* شناسایی شدند. روماند حاصل از این سه جدایه باکتریایی هنگام تیمار با پپسین فقط از رشد *A. flavus* ممانعت کردند و اثر مهارکنندگی بر دو کپک دیگر نداشتند.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که امکان استفاده از باکتری *L. plantarum* و روماند آن برای کنترل رشد کپک‌ها وجود دارد.

کلیدواژه ها: باکتری لاکتیک اسید، پپسین، سلول حرارت دیده، روماند فاقد سلول، فعالیت ضدکپکی

نوع مقاله: پژوهشی

استناد: زارعی یام براتعلی، خمیری مرتضی، موئدی علی، یامچی احد (۱۴۰۱) بررسی فعالیت ضدکپکی باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از خمیرهای سورگوم، ذرت و جو علیه کپک‌های *Aspergillus flavus*، *Penicillium expansum* و *Rhizopus coriniformis*. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی* ۱۴(۱)، ۴۷-۶۶.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

گونه های اصلی قارچ های مسئول فساد مواد غذائی به جنس *Aspergillus*، *Penicillium*، *Fusarium*، *Geotrichum*، *Rhizopus*، آلترناریا و تریکودرما تعلق دارند (Delavenne et al. 2012; Gerez et al. 2009; Matei & Cornea 2014). این قارچها علاوه بر فساد مواد غذائی، منجر به ضررهای اقتصادی و تولید متابولیت‌های سمی مختلف می‌شوند که این متابولیت‌ها، اسپورها و میسیلیوم‌های آلرژی‌زا اثرات سمی مختلفی بر بدن مصرف‌کننده دارند از اینرو وجود کپک‌ها

در موادغذائی و دامی خطر زیادی برای انسان و حیوانات به دنبال دارند (Dalie et al. 2010; Tournas et al. 2011). تاکنون چندین روش فیزیکی (مانند حرارت دادن، خشک کردن، نگهداری سرد، نگهداری با استفاده از اتمسفر اصلاح شده و خشک‌کردن انجمادی) و شیمیایی (استفاده از نگهدارنده‌های مختلف شیمیایی) برای کنترل رشد کپک‌ها در موادغذائی و محصولات کشاورزی مورد استفاده قرار گرفته است که دارای عیوبی مانند هزینه بالا، تاثیرات مضر بر مصرف‌کننده، تاثیر منفی بر ترکیبات غذا، غیرعملی بودن در صنعت و ایجاد مقاومت میکروبی می‌باشند. از اینرو اخیرا استفاده از روش‌های بیولوژیکی و به کارگیری میکروارگانیسم‌های غیرمضر بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (Setty & Jespersen 2006; Muhialdin et al. 2013). در بین میکروارگانیسم‌های دارای توانایی ضدکپکی، باکتری‌های لاکتیک اسید به عنوان مشهورترین و قابل‌قبول‌ترین عوامل بازدارنده بیولوژیک طبیعی شناخته می‌شوند. مکانیسم‌های مختلفی به عنوان مسئول اثر بازدارندگی باکتری‌های لاکتیک اسید بر روی قارچ‌ها پیشنهاد شده است که از این میان می‌توان به رقابت بر سر مواد غذائی، تولید لاکتیک اسید، پروپیونیک اسید، آنتی بیوتیک‌ها، باکتریوسین‌ها، پروکسید هیدروژن و دی اکسید کربن یا ترکیبی از این موارد اشاره کرد (Magnusson et al. 2003; El-Nezami et al. 2000). البته تعیین مکانیسم ضدمیکروبی دقیق باکتری‌های لاکتیک اسید به خاطر پیچیدگی ترکیبات و اثرات هم‌افزائی[1] آن‌ها بر روی یکدیگر بسیار مشکل است (Dalie et al. 2010). در یک مطالعه خاصیت ضدکپکی روماند حاصل از محیط‌کشت MRS مایع، روماند حرارت دیده در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، روماند خنثی شده تا pH برابر ۷ و روماند تجزیه شده توسط کاتالاز، پپسین، تریپسین و پروتئیناز k مربوط به نژادهای مختلف باکتری‌های لاکتیک اسید بر کپک‌های *Aspergillus*، *Penicillium* و *Fusarium* مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که *Aspergillus niger CH 101* مقاوم‌ترین و *Fusarium graminearum CH 103* حساس‌ترین گونه در برابر روماند باکتریایی بود. فعالیت ضدکپکی روماند تیمار شده با حرارت و آنزیم کاتالاز بدون تغییر ماند اما در ۹۰ درصد موارد، فعالیت ضدکپکی روماند خنثی شده با هیدروکسید سدیم، پپسین، تریپسین و پروتئیناز K به‌طور معناداری کاهش یافت. وجود لاکتیک اسید و فنیل لاکتیک اسید در روماند باکتریایی به عنوان علت اصلی خاصیت ضدکپکی گزارش شد (Gerez et al. 2009). همچنین Rouse et al. (2008)، ۴۲۵ باکتری لاکتیک اسید مختلف را از سورگوم قرمز و سفید آفریقایی و گندم و جوی ایرانی جداسازی و خصوصیات ضدکپکی سلول و روماند تیمار شده با حرارت (دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت و ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه) و آنزیم پروتئیناز k را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که چهار ایزوله *Lactobacillus plantarum CM8* *Weissella confusa* I5، *Pediococcus pentosaceus R47* و *Weissella cibaria R16* خواص ضدقارچی شاخص تری داشتند که اثر *P. pentosaceus R47* به صورت غیرمعنادار بیشتر از سایرین بود. دمای اعمال شده تاثیر قابل ملاحظه ای بر خصوصیات ضدکپکی روماند نداشت. ولیکن تیمار آنزیمی باعث از بین رفتن خاصیت ضدکپکی روماند شد. همچنین رشد باکتری در دمای بین ۳۰-۲۵

[1]. Synergistic

درجه سانتیگراد در مقایسه با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد باعث تولید بهینه ترکیبات ضدکپکی گردید. توانایی ایجاد ویژگی ضدکپکی توسط جدای‌های باکتریایی علیه کپک*Penicillium expansum* در میوه سیب باعث شد که این محققین استفاده از این جدایه‌ها را برای کنترل کپک‌زدگی مواد غذائی توصیه نمایند. در مطالعه‌ای دیگر Valerio et al. (2009)، گزارش کردند که هشت عدد از هفده نژاد باکتری لاکتیک اسید جدا شده از سمولینای گندم ایتالیایی توانستند تا ۹۰ درصد از رشد *Endomycopsis fibuligera* ممانعت کنند. رشد *Penicillium roqueforty* تقریبا توسط همه باکتری‌های لاکتیک اسید تا ۶۵/۵ درصد کنترل شد. میزان بازدارندگی از رشد این باکتری‌های لاکتیک اسید با پروپیونیک اسید ۰/۳ درصد قابل مقایسه بود. در مطالعه این محققین، *L. plantarum* موثرترین نژاد با خاصیت ضدکپکی بود. باتوجه به اهمیت باکتری‌های لاکتیک اسید و متابولیت‌های آنها در کنترل رشد کپک‌ها، هدف از انجام این پژوهش، جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های لاکتیک اسید از خمیرهای ذرت، سورگوم و جو، و بررسی تاثیر ضدکپکی سلول‌های زنده، سلول‌های لیز شده توسط اتوکلاو، روماند و روماند تیمار شده با آنزیم‌های پپسین و پروتئیناز K بر کپک‌های *R. coriniformis*، *A. flavus* و *P. expansum* بود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های غلات و تخمیر آن‌ها: این پژوهش از آذر ۱۳۹۶ الی اسفند ۱۳۹۷ در آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه علوم و صنایع غذائی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. نمونه‌های ذرت رقم F2 SC.704، سورگوم رقم کیمیا و جو رقم صحرا از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان (گرگان) تهیه و پس از آرد کردن با افزودن آب به آن (به نسبت ۴۵ به ۵۵)، خمیر تهیه گردید (Madoroba 2009) و در نهایت تخمیر در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد تا رسیدن به pH کمتر از ۴/۷ (pH متر Knick مدل ۷۶۶- آلمان) انجام شد (Vrancken et al. 2011).

شناسایی جدایه‌ها: رقت‌های متوالی از نمونه تهیه و در محیط کشت MRS جامد (لیوفیلچم- ایتالیا) (جهت رشد لاکتوباسیلوس‌ها) (Gerez et al. 2009) و M17 جامد (لیوفیلچم- ایتالیا) (جهت رشد کوکسی‌ها) (Gevers et al. 2003) کشت، و در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند، سپس کلنی‌ها خالص‌سازی و براساس خصوصیات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی مانند کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم (Ferchichi et al. 2007) شناسایی اولیه بر روی آنها انجام شد. به منظور شناسایی باکتری‌ها به روش مولکولی از PCR استفاده شد. استخراج DNA به روش انجماد- ذوب انجام شد (Leroy and De Vuyst 2004). بدین صورت که یک کلنی از روی محیط کشت جامد برداشت و در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد. سپس ۲۰ دقیقه در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در ادامه نمونه از فریزر خارج و در دمای محیط قرار داده شد تا ذوب گردد. مجددا یک شب در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در نهایت از سوسپانسیون بدست آمده به صورت مستقیم به عنوان الگو برای واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Corbett CG1-96- استرالیا) استفاده گردید. واکنش PCR توسط دو پرایمر

27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAC) و 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT) با شرایط دمایی به شرح زیر انجام شد: دمای ذوب اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، دمای ذوب ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، گشترش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، و دمای گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود (Mahmoudi et al. 2021). برای تائید تکثیر قطعات از ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید. محصولات PCR جهت توالی‌یابی به آزمایشگاه دانشکده زیست شناسی دانشگاه تهران ارسال گردید. شناسایی جدایه‌ها بعد از مقایسه توالی جدایه‌ها در پایگاه اطلاعاتی NCBI انجام شد.

فعالسازی کپک‌های مورد آزمون: برای تهیه سوسپانسیون اسپور، ابتدا فعال‌سازی کپک‌های خریداری شده *R. coriniformis*، *A. flavus* و *P. expansum* از مجموعه کشت میکروبی ایران (شهریار کرج، ایران) در محیط کشت PDA (تیتراکم- ایران) به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد (انکوباتور Binder- آلمان) انجام شد. سپس اسپورهای رشد کرده به محلول بافر فسفات سیلین حاوی توئین ۸۰ منتقل شدند و به کمک لام هموسایتومتر، میزان اسپور بر روی ^{6} ۱۰ عدد اسپور در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون تنظیم گردید (Tropcheva et al. 2014).

بررسی خاصیت ضد کپکی سلول‌های زنده باکتری‌های لاکتیک اسید: سلول‌های زنده باکتری‌های لاکتیک اسید جهت بررسی قابلیت ضدکپکی به روش لایه مضاعف[2] مورد آزمون قرار گرفتند. باکتری به صورت نقطه‌ای در مرکز پلیت کشت داده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری گردید تا رشد نماید. سپس مقداری از محیط کشت PDA حاوی ^{4} ۱۰ اسپور در هر میلی‌لیتر کپک بر روی محیط مورد نظر پخش گردید. پلیت‌ها برای رشد کپک در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد تا زمانیکه نمونه شاهد (نمونه فاقد سلول‌های باکتریایی) کل سطح پلیت را بپوشاند گرمخانه‌گذاری گردید. در نهایت قطر ناحیه بازدارندگی اندازه‌گیری شد (Rouse et al. 2008).

بررسی خاصیت ضد کپکی روماند باکتریایی و سلول‌های حرارت دیده بر کپک‌های مورد آزمون: خصوصیات ضد کپکی روماند ایزوله‌های باکتری‌های لاکتیک اسید و سلول حرارت دیده توسط اتوکلاو (۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه) (مدل ۸۷۴۱۹ شرکت زنیس طب- ایران) در فاز لگاریتمی بر روی کپک‌های *R. coriniformis*، *A. flavus* و *P. expansum* به روش لکه‌گذاری بررسی شد. در این روش از مخلوط روماند/ سلول لیز شده بدست آمده در محیط MRS و محیط کشت PDA به عنوان محیطی برای رشد کپک‌ها استفاده شد. بدین منظور در هر پلیت مخلوطی از روماند/ سلول لیز شده و محیط کشت PDA با دو برابر غلظت با نسبت ۱:۱ ریخته شد. PDA با دو برابر غلظت بعد از مخلوط شدن با روماند یا سلول لیز شده مایع (بعد از حذف سلول‌ها توسط سانتریفوژ) به غلظت آگار طبیعی رسید. از مخلوط روماند/ سلول لیز شده بدون تلقیح باکتریایی و محیط کشت PDA با دو برابر غلظت با نسبت ۱ به ۱ به عنوان محیط کشت کنترل استفاده شد. هر پلیت با ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور تهیه

[2]. Overlay

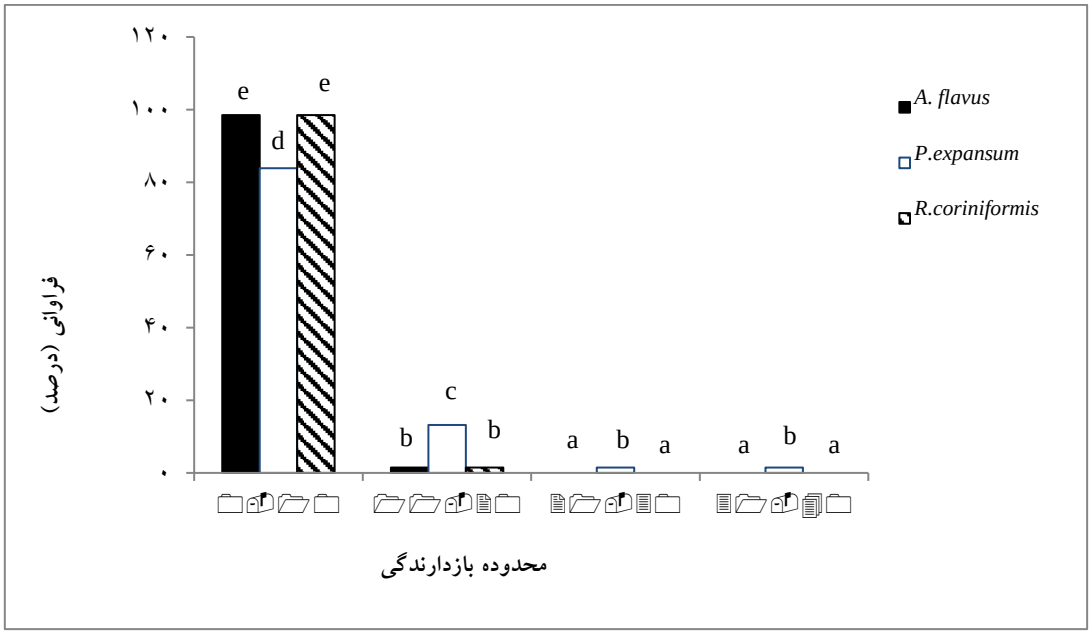
شده در مرحله قبل تلقیح شد. مایع تلقیحی اسپور به صورت یک قطره در مرکز پلیت قرار گرفت. سپس پلیت‌ها به مدت ۶ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. رشد کپک‌ها با ثبت روزانه اندازه قطر هر کلنی مشخص گردید (Khorasanchi et al. 2012).

بررسی اثر ضد قارچی روماند تیمار شده با آنزیم: جهت بررسی اثر ضد قارچی روماند تیمار شده با آنزیم، ابتدا روماند عاری از سلول باکتری‌های لاکتیک اسید در فاز لگاریتمی تهیه و با افزودن هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار بر روی pH: ۷ تنظیم‌گردید. سپس تحت تأثیر آنزیم‌های پپسین (pH: ۲) و پروتئیناز k (pH: ۷/۶) قرار گرفت. pH روماند با توجه به pH بهینه هر آنزیم تنظیم‌گردید. مخلوط بدین‌صورت آماده شد: ۱۰۰ میکروگرم از هر آنزیم در یک میلی‌لیتر روماند به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد (برای پپسین) و ۳۰ دقیقه در ۴۵ درجه سانتیگراد (برای پروتئیناز k) گرمخانه‌گذاری شد. در انتها، خاصیت ضدکپکی روماند تیمار شده پس از کشت در محیط PDB به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، با اندازه‌گیری دانسیته نوری در 580nm (Sdco- آلمان) تعیین شد (Gerez et al. 2013). روماند فاقد آنزیم به عنوان نمونه کنترل به کار برده شد.

آنالیز آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از این پژوهش از طریق آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (One way ANOVA) و آزمون تعقیبی دانکن (Dancan) توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ در سطح احتمال ۵ درصد خطا انجام شد. همچنین جهت ترسیم نمودارها از نرم افزار اکسل (Excel) استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج محدوده بازدارندگی ر شد کپک‌های مورد مطالعه تو سط سلول زنده باکتری‌های لاکتیک ا سید جدا شده از نمونه‌های خمیرترش در شکل ۱ آورده شده است. به‌طور کلی درصد بازدارندگی در برابر کپک‌های *A. flavus*، *P. expansum* و *R. coriniformis* به ترتیب بین ۰ تا ۱۶، ۳۳/۶۴ و ۱۱/۵۶ درصد بود. به‌طور میانگین کمترین اثر ممانعت‌کنندگی بر روی کپک *R. coriniformis* (۰/۵۳ درصد بازدارندگی)، و بیشترین ممانعت‌کنندگی بر روی کپک *P. expansum* (۶/۵۵ درصد بازدارندگی) مشاهده شد و کپک *A. flavus* با ۳/۳۴ درصد بازدارندگی حد واسط بود (نتایج نشان داده نشده است). همانطور که در شکل ۱ آمده است جدایه‌های لاکتیکی حداکثر ۱۰ درصد بازدارندگی را بر هر سه گونه کپکی نشان دادند. اما از این بین، یک جدایه (شماره ۴۷) در محدوده ۳۰-۲۱ در صد، یک جدایه (شماره ۶۲) در محدوده ۴۰-۳۱ در صد، و یک جدایه (شماره ۵۶) در محدوده ۲۰-۱۱ درصد اثر بازدارندگی بر روی *P. expansum* نشان دادند. در کل این سه جدایه به عنوان جدایه‌های برتر از نظر فعالیت ضدکپکی بودند. بجز جدایه شماره ۶۰، تمامی جدایه‌ها اثر ممانعت از ر شد بر روی کپک *P. expansum* دا شتند. به‌طور کلی در بین تمامی جدایه‌ها، جدایه شماره ۶۲ بالاترین اثر ممانعت‌کنندگی را بر روی هر سه کپک داشت. شکل ۲ تاثیر سلول‌های زنده سه جدایه برتر (۴۷، ۵۶ و ۶۲) را بر کپک‌های *P. expansum*، *A. flavus* و *R. Coriniformis* نشان می‌دهد.



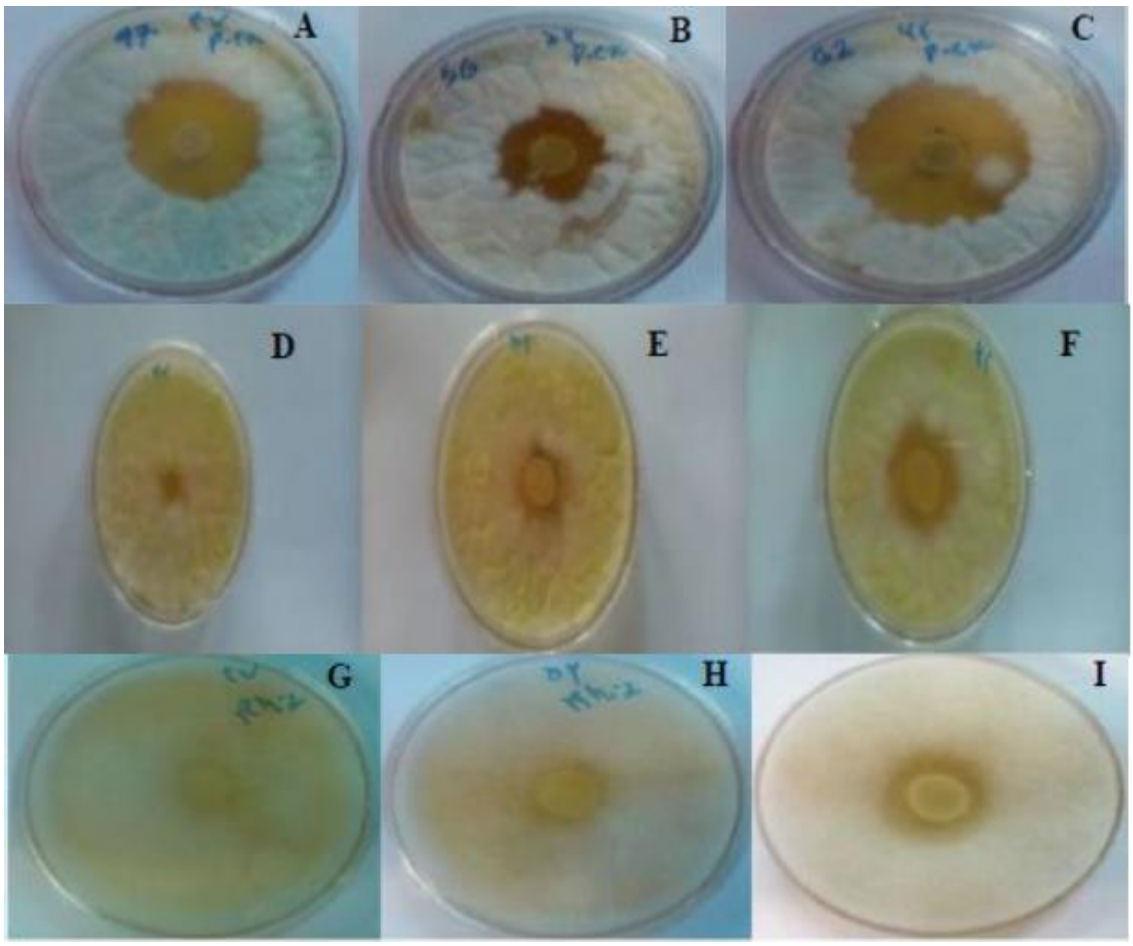
شکل ۱. محدوده بازدارندگی سلول زنده مربوط به ٦٨ جدایه لاکتیکی علیه کپک‌های مورد مطالعه

Figure 1. Live cell inhibitory range of 68 lactic isolates against the studied molds

نتایج فعالیت ممانعت‌کنندگی روماند جدایه‌های لاکتیکی در محیط کشـــت MRS مایع، بر کپک‌های مورد مطالعه در این پژوهش در شکل ۳ نشان داده شده است. درصد ممانعت از رشد بر روی همه کپک‌های مورد مطالعه بین ۰ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود. بیشـــترین فراوانی جدایه‌های باکتریایی در محدوده بین ۳۰-۰ درصـــد بر روی کپک *R. coriniformis* اثر ممانعت‌کنندگی داشتند درحالی که این ممانعت از رشد بر روی کپک *P. expansum* در محدوده ۱۰۰-۹۰ درصد بود که نشان از حساس بودن این کپک به روماند اکثر جدایه‌ها داشـت. البته یک اسـتثناء وجود داشـت به‌طوریکه جدایه شـماره ۵۱ بدون اثر بازدارندگی بر روی کپک *P. expansum* بود درحالی که ۱۰۰ درصـــد بازدارندگی بر روی دو گونه کپکی دیگر داشـــت. در کل به‌طور میانگین، *R. coriniformis* مقاوم‌ترین گونه (۳۲/۴۱ درصد بازدارندگی) و *P. expansum* حساس‌ترین گونه کپکی (۷۶/۴۵ درصد ممانعت کنندگی) نسبت به روماند باکتری‌های لاکتیک اسید در این مطالعه بود. اثبات شده است که روماند باکتری‌های لاکتیک اسید باعث آسیب به دیواره سلولی و غشاء سیتوپلاسمی و تخریب اجزایی مانند میتوکندری و هسته در کپک‌ها می‌شود (Sangmanee & Hongpattarakere 2014). در مطالعه حاضر به‌صورت کلی، کپک *P. expansum* بیشترین حساسیت را نسبت به سلول‌های زنده باکتریایی، روماند باکتریایی و سـلول‌های لیزشـده با حرارات داشـت. اما بین جدایه‌های مختلف تفاوت‌هایی نیز وجود داشـت. به‌طوریکه برخی جدایه‌ها تاثیر بیشتری بر کپک *A. flavus* داشتند. همچنین به‌طور میانگین، کپک *R. coriniformis* مقاومت بالاتری به سلول‌های زنده و روماند باکتریایی داشت و از این نظر بعد از *P. expansum* و *A. flavus* در رتبه سوم مقاومت قرار

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

گرفت. در حالی که این گونه کپکی (نسبت به *A. flavus*) حساسیت بالاتری نسبت به سلول‌های لیز شده باکتریایی داشت و از این نظر بعد از *P. expansum* در رتبه دوم قرار گرفت (شکل‌های ١، ٣ و ۴).

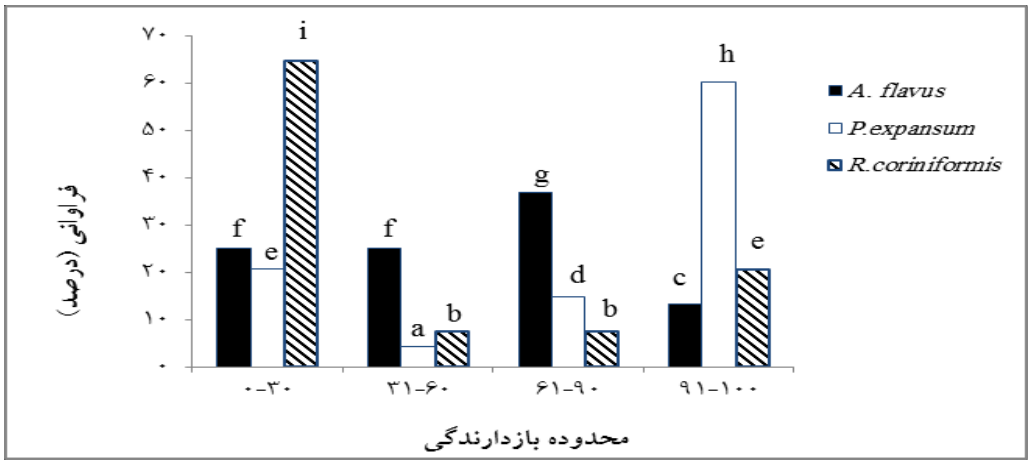


شکل ٢. حروف B, A و C به ترتیب بازدارندگی سلول زنده جدایه‌های شماره ٤٧، ٥٦ و ٦٢ بر کپک *P. expansum*، E, D و F به ترتیب بازدارندگی سلول زنده جدایه‌های شماره ٤٧، ٥٦ و ٦٢ بر کپک *A. flavus*، H, G و I به ترتیب بازدارندگی سلول زنده جدایه‌های شماره ٤٧، ٥٦ و ٦٢ بر کپک *R. coriniformis*

Figure 2. Letters B, A, and C, live cell inhibition of isolates 47, 56, and 62 on the mold of *P. expansum*, respectively, E, D, and F, live cell inhibition of isolates 47, 56, and 62 on the mold of *A. flavus*, respectively, H, G and I, live cell inhibition of isolates 47, 56 and 62 on *R. coriniformis* mold respectively

بنابراین بین گونه‌های باکتریایی از نظر خواص ضدکپکی تفاوت وجود داشت. همچنین گونه‌های مختلف کپکی نیز حساسیت متفاوتی نسبت به گونه‌های باکتریایی و متابولیت‌های آنها داشتند. این حقیقت در نتایج سایر محققان نیز قبلا گزارش شده است. برای مثال نتایج تحقیقات Garofalo et al. (2012) نشان دادند که *Penicillium* حساس‌ترین کپک نسبت به روماند

باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از خمیرترش گندم بود به‌طوریکه ۴۰ درصد جدایه‌ها، اثر بازدارندگی نسبت به این گونه کپک داشتند درحالی که آسپرژیلوس مقاوم‌ترین گونه بود. اما در مطالعه Horackova et al. (2018) اثبات شد که سلول زنده باکتری‌های لاکتیک اسید حاصل از خمیرترش و روماند آنها تاثیر بازدارندگی کمتری بر *P. expansum* در مقایسه با *Fusarium culmorum* داشتند.

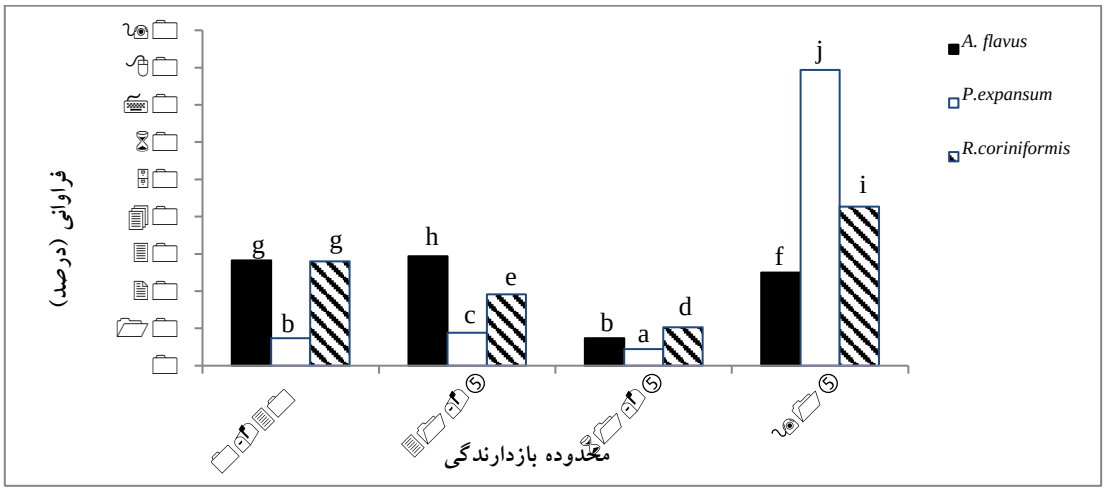


شکل ۳. محدوده بازدارندگی روماند مربوط به ٦٨ جدایه لاکتیکی علیه کپک‌های مورد مطالعه

Figure 3. Supernatant inhibitory range of 68 lactic isolates against the studied molds

در برخی مطالعات نیز اثبات شده ا ست که ع صاره فیلتر شده و تغلیظ شده *L. plantarum 21B* جدا شده از خمیرترش به‌طور کامل از رشد کپک‌های *Penicillium corylophilum*، *P. roqueforty*، *P. expansum*، *A. niger*، *A. flavus* و *F. graminearum* جلوگیری کرد درحالی که سایر جدایه‌ها به‌طور کامل بر روی همه کپک‌های مذکور اثر بازدارندگی نداشتند (Lavermicocca et al. 2000). مشابه با تحقیق حاضر، Rather et al. (2013)، ۱۴۰۰ جدایه لاکتیکی را از کیمچی تخمیری جداسازی و فعالیت ضدکپکی روماند آنها علیه *A. niger* را بررسی کردند. مشخص شد که *L. plantarum* نژاد YML007 بالاترین خاصیت ضدکپکی را داشت. این نژاد بر *A. flavus*، *Aspergillus oryzae* و *Fusarium oxysporum* نیز اثرمهارکنندگی رشد داشت. همچنین در سایر مطالعات نیز ثابت شده است که این نژاد باکتریایی (*L. plantarum*) اثرات قوی بازدار ندگی بر علیه کپک های *Rhizopus stolonifer* (Sathe et al. 2007) و *Rhizopus nigricans* دارد (Zhang et al. 2016). نتایج حاصل از درصد ممانعت از رشد سلول‌های حرارت دیده باکتریایی توسط اتوکلاو بر روی کپک‌های مورد مطالعه در این تحقیق در شکل ۴ نشان داده شده است. بیشترین جدایه‌ها اثر بازدارندگی بر *A. flavus* را بین محدوده فراوانی ۹۰-۶۱ درصد داشتند که اختلاف معناداری با محدوده‌های ۶۰-۳۱ و ۳۰-۰ نشان دادند ($P<0.05$). در مورد کپک‌های *P. expansum* و *R. coriniformis*، بیشترین فراوانی جدایه‌های با خاصیت ضدکپکی در محدوده ۱۰۰-۹۱ درصد بود که نشان دهنده حساس‌تر بودن این دو گونه کپکی به سلول حرارت دیده اکثر جدایه‌های باکتریایی بود. در کل *A. flavus*

بالاترین مقاومت را به سلول‌های لیز شده باکتریایی (۴۴/۹۸ درصد بازدارندگی) و *P. expansum* بالاترین حساسیت را داشتند (۸۸/۴۵ درصد ممانعت از رشد) در حالی که *R. coriniformis* با ۶۲/۵۳ درصد بازدارندگی، بین این دو قرار داشت (نتایج نشان داده نشده است). براساس تمامی نتایج، سه جدایه شماره ۴۷، ۵۶ و ۶۲ به عنوان جدایه‌های برتر برای ادامه کار انتخاب شدند. این جدایه‌ها به ترتیب از خمیرهای سوروگوم، جو و ذرت جداسازی شده بودند.



شکل ٤. محدوده بازدارندگی سلول حرارت دیده مربوط به ٦٨ جدایه لاکتیکی علیه کپک‌های مورد مطالعه

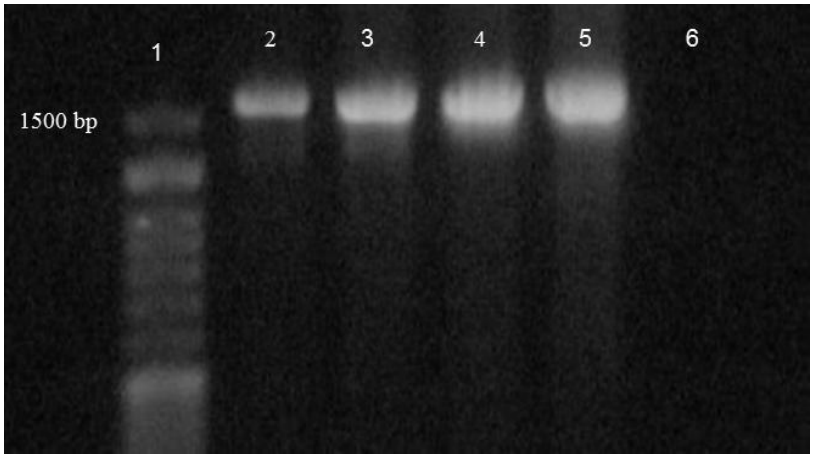
Figure 4. The inhibitory range of the heated cell of 68 lactic isolates against the studied molds

در مطالعه حاضر، سلول‌های حرارت‌دیده توسط اتوکلاو تاثیر ضدکپکی بیشتری بر *P. expansum* (۸۸/۴۵ درصد بازدارندگی) و *R. coriniformis* (۶۲/۵۳ درصد ممانعت) در مقایسه با سلول حرارت‌ندیده (به ترتیب ۷۶/۴۵ و ۳۲/۴۱ درصد ممانعت) داشتند. در حالی که این موضوع بر روی کپک *A. flavus* صادق نبود به‌طوریکه سلول‌های حرارت‌ندیده باکتریایی تاثیر ممانعت‌کنندگی بالاتری (۵۵/۲۸ درصد) نسبت به سلول اتوکلاو شده داشت (۴۴/۹۸ درصد) (نتایج نشان داده نشده است). دلیل این امر می‌تواند بخاطر تفاوت متابولیت‌های تولیدشده توسط جدایه‌های باکتریایی مختلف باشد که حساسیت متفاوتی نسبت به حرارت دارند. همچنین آزادشدن برخی متابولیت‌های داخل سلولی در طی حرارت دادن و متلاشی شدن سلول نیز می‌تواند بر خواص ضدمیکروبی آن تاثیرگذار باشد که در مطالعات مختلف به آن اشاره شده است. مثلا در مطالعه Gourama and Bullerman (1995)، روماند حرارت‌ندیده باکتری‌های لاکتیک اسید تاثیر ضدکپکی بالاتری نسبت به روماند حرارت‌دیده داشت. به صورت مشابه، در مطالعه Assohoun-Djeni et al. (2016)، حرارت دادن روماند باکتری‌های لاکتیک اسید در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، اثرات ضد میکروبی آن را به‌طور کامل از بین برد. همچنین Corsetti et al. (2008) نیز نشان دادند که حرارت (۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه، ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه و استریلیزاسیون در ۱۲۱ درجه

سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه) بر روی ویژگی‌های ضدمیکروبی روماند باکتری‌های لاکتیک اسید تاثیرگذار بود به‌طوریکه بازدارندگی این ترکیبات را به‌طور قابل ملاحظه ای کاهش داد و اعمال فرآیند استریلیزاسیون اثر بازدارندگی آن‌ها را کاملا از بین برد. به علاوه، Gourama and Bullerman گزارش کردند که روماند حرارت‌دیده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد و روماند استریل‌شده با اتوکلاو تاثیر بسیار کمی بر اسپورزائی کپک *A. flavus subsp. Parasiticus* داشت. اما در مطالعه Garofalo et al. (2012)، تیمار حرارتی Lactobacillus paralimentarius باعث کاهش اثر ضدکپکی روماند آن نشد. یکی از فاکتورهای تاثیرگذار بر خصوصیات ضدکپکی باکتری‌های لاکتیک اسید، دمای گرمخانه‌گذاری است. ثابت شده است که بهترین زمان و دمای گرمخانه گذاری باکتری‌های لاکتیک‌اسید برای حصول بهترین اثر ضدکپکی، زمان ۴۸ ساعت و دمای بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد است (Dalie et al. 2010) که در مطالعه حاضر نیز از دمای ۲۶ درجه سانتیگراد برای گرمخانه‌گذاری استفاده شد که بیشترین رشد جدایه‌ها را به همراه داشت (از نظر کدورت). شکل ۵ نشان می‌دهد که تکثیر توالی هدف ۱۵۰۰ جفت باز مربوط به سه ایزوله منتخب از بین ۶۸ ایزوله جدا شده با موفقیت انجام شد. سپس اقدام به توالی یابی محصول PCR شد. نتیجه توالی‌یابی بعد از مقایسه توالی جدایه‌ها در پایگاه اطلاعاتی NCBI مشخص نمود که هر سه جدایه، *L. plantarum* بودند.

خمیرترش یک سیستم بسیار پیچیده است که انواع مختلف میکروارگانیزم‌ها را در بر می‌گیرد. در بین آن‌ها تعداد نسبتا زیادی از گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس‌ها حضور دارند (Settanni et al. 2011). تا کنون ۸۰ گونه باکتری لاکتیک اسید از خمیرترش جداسازی شده اند (Ganzle & Ripari 2016) که *L. plantarum* و *L. sanfrancisensis* در ۵۰ درصد از خمیرترش‌های مورد آزمون یافت شده‌اند (De Vuyst et al. 2014). برخی تحقیقات نیز نشان داده است که *L. fermentum* و *L. plantarum* معمولترین گونه‌های باکتری‌های لاکتیک سید مرتبط با تخمیر خودبخودی فرآورده‌های غلات هستند (Kunene et al. 2000). در هرصورت *L. plantarum* گونه‌ای است که به‌طور ثابت از تخمیرهای خودبخودی غلات جداسازی شده است که در مطالعه حاضر نیز از هر سه نمونه ذرت، جو و سورگوم تخمیر شده جداسازی شد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج سایر محققان مطابقت داشت که *L. plantarum* را از محصولات تخمیرشده ذرت مانند توگوا[3] (Mugula et al. 2003)، بوشرا[4] (Muyanja et al.2003)، اوگی[5] (Teniola et al. 2005; Caplice & Fitzgerald 1999)، کنکی[6] (Olsen et al. 1995; Annan et al. 2015; Uzochukwu et al. 2016) و سورگوم تخمیرشده مانند تینگ[7] (Sekwati-Monang & Gänzle 2011; Madoroba 2009) یا مخلوطی از ارزن، ذرت و سورگوم تخمیر شده مانند محصولات تخمیری سنتی کنیا و اوگاندا (اوگی و اوجی[8]) (Liptáková et al. 2017) جداسازی کرده بودند.

3. Togwa
4. Bushera
5. Ugi
6. Kenkey
7. Ting
8. Uji



شکل ٥. چاهک شماره ١: لدر، چاهک ٢: جدایه شماره ٤٧، چاهک ٣: جدایه شماره ٥٦، چاهک ٤: جدایه شماره ٦٢، چاهک ٥: کنترل مثبت، چاهک ٦: کنترل منفی

Figure 5. Well No. 1: Ladder, Well 2: Isolate No. 47, Well 3: Isolate No. 56, Well 4: Isolate No. 62, Well 5: Positive control, Well 6: Negative control

بعضی از باکتری‌های لاکتیک اسید، مسیرهای متابولیکی برای افزایش رقابت پذیری در محیط دارند. مثلا *L. plantarum* دارای آنزیم‌ها و ناقل‌هایی[9] در تخمیر کربوهیدارت‌هاست (قادر به استفاده از منابع کربوهیدراتی مختلف) که باعث غالب شدن آن در اکو سیستم‌های تخمیری غذائی بر پایه گیاهان مانند غلات می شود (Boekhorst et al. 2004; De Vuyst et al. 2009). البته ترکیب فلورمیکروبی خمیرترش تحت تاثیر فرآیند تخمیر به خصوص دما، زمان و بازده خمیر نیز قرار می‌گیرد (De Vuyst & Vancanneyt 2007; Vogel et al. 2002). همچنین سوبسترای موجود در هر دانه غله‌ای و متابولیت‌های تولید شده توسط فلور میکروبی آن باعث تفاوت و غالب شدن فلور میکروبی خاص آن خواهد شد (Sekwati-Monang et al. 2012; Gänzle et al. 2009). نتایج آزمون ضدکپکی روماند تیمارشده با آنزی‌های پروتئولیتیک پپسین و پروتئیناز K در جدول ١ آورده شده است. نتایج نشان داد که فقط روماندهای تیمار شده با پپسین دارای خاصیت ممانعت‌کنندگی از رشد کپک‌ها بودند و در سایر موارد، تیمارهای آنزیمی بی تاثیر بودند. روماند جدایه شماره ۴۷ که با پپسین تیمار شده بود بالاترین اثر بازدارندگی را بر روی کپک *A. flavus* داشت (۵۴/۳ درصد بازدارندگی) و همین آنزیم در مورد جدایه شماره ۶۲ کمترین اثر بازدارندگی از رشد را بر روی کپک مذکور داشت (۴/۲ درصد) (جدول ١). مشابه با یافته‌های ما، نتایج Corsetti et al. (2008) در بررسی تاثیر آنزیم‌های مختلف پروتئولیتیک (پروتئیناز K، پروتئیناز B و تریپسین) آمیلیولیتیک (آلفا آمیلاز) و لیپولیتیک (لیپاز) بر روماند باکتری‌های لاکتیک اسید نشان داد که ترکیبات ضدمیکروبی حاصل از ١۶جدایه لاکتیکی به وسیله آنزیم‌های پروتئولیتیک غیرفعال شدند که نشان داد ترکیبات بازدارنده ماهیت پروتئینی داشتند. در مطالعه Assohoun-Djeni et al. (2016)، خاصیت ضدباکتریایی روماند خنثی

[9]. Transporters

شـده باکتری‌های لاکتیک اسـید تحت تاثیر کاتالاز قرار نگرفت اما تیمار کردن روماند با آنزیم کیموتریپسـین اثرات ضـدمیکروبی روماند را به‌طور کامل از بین برد که نشان دهنده تفاوت آنزیم‌ها بر خصوصیات ضدکپکی روماند بود که در مطالعه ما نیز به نوعی مشاهده شد. همچنین می‌توان گفت نتایج ما با یافته‌های Garofalo et al. (2012) مطابقت داشت. این محققین گزارش کردند که خاصـیت ضـدکپکی روماند باکتری‌های لاکتیک اسـید (جدا شـده از خمیرترش گندم) تیمار شـده با آنزیم‌های پروتئولیتیک (تریپسین، کیموتریپسین و پروناز[10]) کاهش یافت.

جدول ۱. بازدارندگی ضدکپکی روماند تیمار شده با آنزیم‌های پپسین و پروتئیناز k

Table 1. Antifungal inhibition of supernatant treated with pepsine and proteinase k enzymes

آنزیم Enzyme	پپسین Pepsin			پروتئیناز k Proteinase K		
جدایه Isolate	*A. flavus*	*P. expansum*	*R. coriniformis*	*A. flavus*	*P. expansum*	*R. coriniformis*
47	54.3±1.7^{c}	0±0^{a}	0±0^{a}	0±0^{a}	0±0^{a}	0±0^{a}
56	13.5±0.6^{b}	0±0^{a}	0±0^{a}	0±0^{a}	0±0^{a}	0±0^{a}
62	4.2±0.6^{a}	0±0^{a}	0±0^{a}	0±0^{a}	0±0^{a}	0±0^{a}

در مطالعه ما از هر سـه نمونه خمیر ذرت، سـورگوم و جو *L. plantarum* جداسـازی شـد که یک باکتری هتروفرمنتاتیو اختیاری است که در بسیاری از مطالعات از خمیرهای ترش جداسازی شده است (Ventimiglia et al. 2015; De Vuyst & Neysens 2005; Alfonzo et al. 2013). پلانتاریسـین[11] یک باکتریوسـین تولید شـده توسـط این گونه اسـت که خواص ضدقارچی آن به اثبات رسیده است. البته تولید ترکیبات ضد میکروبی در همه نژادهای *L. plantarum* عمومیت ندارد. خواص ضدکپکی این گونه به نژاد آن نیز بستگی مستقیم دارد. مثلا Dal Bello et al. (2007) گزارش کردند که *L. plantarum* نژاد *FST 1.7* خاصیت ضدقارچی علیه *A. niger* و چهار نژاد *Fusarium* داشت اما هیچ اثری بر *Penicillium* نداشت که این موضوع در تحقیقات Taghi Zadeh and Nejati (2017) در مورد جدایه شناسایی شده به عنوان *L. plantarum* نیز اثبات شد. بعضی از گونه‌های قارچی مانند *A. flavus*, *P. roqueforti*, *Cladosporium spp* و *A. niger* مقاومت بالایی به متابولیت‌های تولید شده توسط *L. plantarum* دارند به‌طوریکه ۶۰ تا ۸۰ در صد نژادهای *L. plantarum* قادر به ممانعت از رشد این کپک‌ها نیستند (Russo et al. 2017). این موضوع نشان می‌دهد که همه نژادهای این گونه باکتریایی توانایی یکسانی در ممانعت از رشد کپک‌ها ندارند.

[10]. Pronase
[11]. Plantaricin

نتیجه‌گیری: در کل، نتایج این مطالعه نشان داد که فعالیت ضدکپکی سلول زنده و متابولیت گونه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از نمونه‌های خمیرترش به خصوص گونه *L. plantarum* پتانسیل استفاده برای کنترل رشد کپک‌های *A. flavus*، *P. expansum* و *R. coriniformis* را دارند. این خصوصیت ضدکپکی باکتری‌های لاکتیک اسید به دلیل تولید ترکیباتی است که شرایط را برای رشد کپک‌ها نامساعد کرده و از این طریق منجر به افزایش ماندگاری مواد غذائی می شوند. عوامل زیادی بر میزان اثرگذاری ترکیبات ضد کپکی تولیدی توسط باکتری‌های لاکتیک اسید مؤثر هستند که از آن جمله می‌توان به زمان انکوباسیون، pH و ترکیبات محیط اشاره کرد. تحقیق حاضر نشان داد باکتری‌های لاکتیک اسید دارای پتانسیل مناسبی در مهار رشد کپک می‌باشند. البته مطالعات بیشتری برای تعیین اثرات ضدکپکی این باکتری‌ها باید انجام شود. انتظار می‌رود در آینده ترکیبات طبیعی مهارکننده عوامل فساد، از خمیرترش جداسازی و جهت افزایش ماندگاری محصولات غذائی و کشاورزی، به کار برده شوند.

سپاسگزاری: بدین وسیله از زحمات جناب آقای دکتر محمد تقی فیض بخش در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان جهت همکاری در تهیه نمونه‌های ذرت، جو و سورگوم تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

خراسانچی ن، پیغمبردوست ه، گلشن تفتی ا، حجازی م ا، رافت ع (١٣٩٠) ارزیابی قابلیت خمیرترش مایع حاوی آغازگرهای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس روتری* در جلوگیری از فساد قارچی نان. نشریه پژوهش‌های صنایع غذائی ٢١(٣)، ٣٩١-٤٠٠.

References

Alfonzo A, Ventimiglia G, Corona O, et al. (2013) Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of wheat flours. J Food Microbiol 36, 343-354.

Annan T, Obodai M, Anyebuno G, et al. (2015) Characterization of the dominant microorganisms responsible for the fermentation of dehulled maize grains into nsiho in Ghana. Afr J Biotechnol 14 (19), 1640-1648

Assohoun-Djeni NMC, Djeni NT, Messaoudi S, et al. (2016) Biodiversity, dynamics and antimicrobial activity of lactic acid bacteria involved in the fermentation of maize flour for doklu production in Côte d'Ivoire. J Food Cont 62, 397–404

Boekhorst J, Siezen RJ, Zwahlen MC, et al. (2004) The complete genomes of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus johnsonii* reveal extensivedifferences in chromosome organization and gene content. J Microbiol 150, 3601-3611.

Caplice E, Fitzgerald GF (1999) Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. Int J Food Microbiol 50, 131-149.

Corsetti A, Settanni L, Braga TM, et al. (2008) An investigation of the bacteriocinogenic potential of lactic acid bacteria associated with wheat (Triticum durum) kernels and non-conventional flours. J LWT - Food Sci Technol 41 (7), 1173-1182.

Dal Bello F, Clarke C, Ryan L, et al. (2007) Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain Lactobacillus plantarum FST 1.7. J Cereal Sci 45(3), 309-318.

Dalie DKD, Deschaps AM, Richard-forget F (2010) Lactic acid bacteria–Potential for controlof mould growth and mycotoxins: A review. *J Food Contr* 21, 370-380.

Delavenne E, Ismail R, Pawtowski A, et al. (2012) Assessment of *lactobacilli* strains as yogurt bioprotective cultures. *J Food Contr* 30, 206-213.

De Vuyst L, Van Kerrebroeck S, Harth H, et al. (2014) Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? J Food Microbiol 37, 11-29.

De Vuyst L, Neysens P (2005) The sourdough microflora: Biodiversity and metabolic interactions. J Tren in Food Sci Technol 16, 43-56.

De Vuyst L, Vancanneyt M (2007) Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. J Food Microbiol 24, 120-127.

De Vuyst L, Vrancken G, Rimaux T, et al. (2009) Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. J Food Microbiol 26, 666-675.

El-Nezami H, Mykanen H, Kankaanpaa P, et al. (2000) Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B1 from the chicken duodenum. *J Food Protec* 63, 549–552.

Ferchichi M, Valcheva R, Vost H, et al. (2007) Molecular identification of the microbiota of french sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. *J Food Microbiol* 24 (7-8), 678-86.

Gänzle MG, Zhang C, Sekwati-Monang B, et al. (2009) Novel metabolites from cereal-associated lactobacilli—novel functionalities for cereal products? J Food Microbiol 26, 712–719.

Ganzle M, Ripari V (2016) Composition and function of sourdough microbiota: From ecological theory to bread quality. Int J Food Microbiol 239, 19-25.

Garofalo C, Zannini E, Aquilanti L, et al. (2012) Selection of Sourdough Lactobacilli with Antifungal Activity for Useas Biopreservatives in Bakery Products. J Agric Food Chem 60, 7719−7728.

Gerez CL, Torres MJ, Font de Valdez G, et al. (2013) Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *J Biolog Contr* 64, 231–237.

Gerez CL, Torino IM, Rollan G, et al. (2009) Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *J Food Contr* 20, 144-148.

Gevers D, Danielsen M, Huys G, et al. (2003) Molecular characterization of *tet (M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *J Appl Env Microbiol* 69, 1270-1275.

Gourama H, Bullerman L (1995) Inhibitionof Growth and Aflatoxin Productionof *Aspergillus flavus* by Lactobacillus Species. J Food Protec 58 (11), 249-256.

Horackova S, Novakova T, Slukova M, et al. (2018) Antifungal Activity of Selected Lactobacilli Intended for Sourdough Production. J Appl food biotechnol 5(4), 213-220.

Khorasanchi N, Peighambardoust SH, Golshan Tafti,A, et al. (2012) Evaluating the ability of liquid sourdough containing L. plantarum and L. reuteristarters in inhibition of bread mold spoilage. J Food Scie Res 21 (3), 391-400 (in Persian).

Kunene NF, Ifigenia G, Alexander Von H, et al. (2000) Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented weaning food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. J Appl Env Microbiol 66 (3), 1084-1092.

Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, et al. (2000) Purification and characterization of novel antifungal compounds from sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21 B. J Appl Env Microbiol 66, 4084-4090.

Leroy F, De Vuyst L (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trend Food Scie Technol 15 (2), 67-78.

Liptáková D, Matejčeková Z, Valík L (2017) Fermentation Processes. In: Lactic Acid Bacteria and Fermentation of Cereals and Pseudocereals. Intech press, pp. 223-254.

Madoroba E (2009) Molecular characterization and population dynamics of lactic acid bacteria during the fermentation of sorghum. PhD Thesis, University of Pretoria, South Africa.

Magnusson J, Strom K, Roos S, et al. (2003) Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *J FEMS Microbiol Let* 219, 129-135.

Mahmoudi M, Khomeiri M, Saeidi M, et al. (2021) Lactobacillus Species from Iranian Jug Cheese: Identification and Selection of Probiotic Based on Safety and FunctionalProperties. J App food biotechnol 8 (1), 47-56.

Matei A, Cornea C (2014) Antifungal activity of some lactic acid bacteira isolated from materials of vegetal origin. *J Scient Bull Seri Facu Biotechnol* 18, 42-47

Mugula JK, Nnko SAM, Narvhus JA, et al. (2003) Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. Int J Food Microbiol 80, 187-199.

Muhialdin BJ, Hassan Z, Saari N (2013) Lactic Acid Bacteria in Biopreservation and the Enhancement of the Functional Quality of Bread, InTech press, chapter 6, pp:167-184. DOI: 10.5772/51026.

Muyanja CMBK, Narvhus JA, Treimo J, et al. (2003) Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from bushera: A Ugandan traditional fermented beverage. Int J Food Microbiol 80, 201-210.

Olsen A, Halm M, Jakobsen M (1995) The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interactions during fermentation. J Appl Bacteriol 79(5), 06-51.

Rather IA, Seo BJ, Kumar VJR, et al. (2013) Isolation and characterization of a proteinaceous antifungal compound from Lactobacillus plantarum YML007 and its application as a food preservative. J Let Appl Microbiol 57(1), 69–76.

Russo P, Arena MP, Fiocco D, et al. (2017) Lactobacillus plantarum with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. Int J Food Microbiol 247, 48–54.

Rouse S, Harnett D, Vaughan A, et al. (2008) Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungalspoilage in foods. J Appl Microbiol 104, 915–923.

Sangmanee P, 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*. J Food Contr 40, 224-233.

Sathe SJ, Nawani NN, Dhakephalkar PK, et al. (2007) Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. J Appl Microbiol 103 (6), 2622–2628.

Sekwati-Monang B, Gänzle MG (2011) Microbiological and chemical characterisation of ting, a sorghum-based sourdough product from Botswana. Int J Food Microbiol 150, 115–121.

Sekwati-Monang B, Valcheva R, Gänzle MG (2012) Microbial ecology of sorghum sourdoughs: Effect of substrate supply and phenolic compounds on composition of fermentation microbiota. Int J Food Microbiol 159, 240–246.

Settanni L, Tanguler H, Moschetti G, et al.(2011) Evolution of fermenting microbiota in tarhana produced under controlled technological conditions. J Food Microbiol 28, 1367-1373.

Setty PH, Jespersen L (2006) *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *J Tren Food Sci Technol* 17, 48-55.

Taghi Zadeh A, Nejati F (2017) Screening of Lactic Acid Bacteria Isolated from Iranian sourdoughs for Antifungal Activity: Enterococcus faecium showed the Most Potent Antifungal Activity in Bread. Appl food biotechnol 4(4), 219-227.

Teniola OD, Odunfa SA, Holzapfel WH (2005) Selection, use and the influence of starter cultures in the nutrition and processing improvement of ogi. In: Proceedings of the Second International Workshop: Food-based approaches for a healthy nutrition. Brouwer et al. (Eds.). Presses Universitaires de Ouagadougou, Burkina Faso, pp. 697-708.

Tournas VH, Rivera calo J, Memon S (2011) Comparison of the SimPlate yeast and mould color indicator to the BAM method for quantification of fungi in naturally-contaminated foods. *J Food Contr* 22 (5), 775-777.

Tropcheva R, Nikolova D, Evstatieva Y, et al. (2014) Antifungal activity and identification of *Lactobacilli* isolated from traditional dairy product "katak". *J Anaer* 28 (1), 78-84.

Uzochukwu N, Onyefulu Ch, Chukwuemeka I (2016) Isolation of lactic acid bacteria during fermentation of cereals using morphological, physiological and biochemical techniques. Afri J Agri Food Secu 4(1), 145-149.

Valerio F, Favilla M, De Bellis P, et al. (2009) Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from asemolina ecosystem against *Penicillium roqueforti, Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. System Appl Microbiol 32, 438–448.

Ventimiglia G, Alfonzo A, Galluzzo P, et al. (2015) Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. Food Microbiol 51, 57-68.

Vogel RF, Ehrmann MA, Gänzle MG (2002) Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem. J Anton van Leeuwen 81, 631-638.

Vrancken G, Rimaux T, Weckx S, et al. (2011) Influence of temperature and backslopping time on the microbiota of a type I propagated laboratory wheat sourdough fermentation. *J Appl Env Microbiol* 77, 2716–2726.

Zhang N, Liu JH, Li JJ, et al. (2016) Characteristics and application in food preservatives of Lactobacillus plantarum TK9 isolated from naturally fermented congee. Int J Food Eng 12(4), 377–384.