نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد یازدهم، شماره دوم، ۹۸
۳۵-۴۸
http://ejfpp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/ejfpp.2020.16332.1532

فعالیت ضد قارچی شیرهای تخمیرشده با استفاده از کشت‌های منفرد یا ترکیبی لاکتیک اسید باکتری‌های پروتئولیتیک

شهرام لقمان[۱]، علی مویدی[۲*]، ماندانا محمودی[۳]، مرتضی خمیری[۴]

[۱]دانش آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۲]استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۳]دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۴]استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۰۹

چکیده

سابقه و هدف: در سال‌های اخیر استفاده از لاکتیک اسید باکتری‌ها به عنوان کشت‌های حفاظتی در تولید فراورده‌های تخمیری گسترش یافته است. بخش قابل توجهی از فعالیت ضد قارچی لاکتیک اسید باکتری‌ها به متابولیت‌های تولید شده توسط آن‌ها به‌ویژه اسیدهای آلی مختلف مربوط می‌شود. با این حال، اخیرا پپتیدها و هیدرولیز شده‌های پروتئینی نیز به عنوان ترکیباتی که فعالیت ضد قارچی دارند معرفی شده‌اند. هدف از این پژوهش، بررسی فعالیت جداره‌های لاکتیک اسید باکتری‌های پروتئولیتیک در تولید شیر تخمیرشده با خاصیت ضدقارچی بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، شیر بدون چربی استریل شده با کشت‌های منفرد و ترکیبی *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*، *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* تلقیح (۲ درصد، وزنی-وزنی) و فرآیند تخمیر با گرم‌خانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به pH مطلوب ۴/۶-۴/۵ انجام گرفت. محتوای پپتیدی و نیز خاصیت ضد قارچی عصاره پپتیدی به‌دست آمده از شیرهای تخمیر شده در برابر *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و *کاندیدا آلبیکنس* پس از انجام تخمیر و پس از ۷ روز نگهداری در یخچال بررسی شد.

یافته‌ها: *لاکتوباسیلوس روتری* کمترین فعالیت پروتئولیتیک را در شیر نشان داد و در بین تمام نمونه‌ها، بیشترین محتوای پپتیدی به میزان ۶/۶۲ میلی‌گرم پپتید در هر میلی‌لیتر در نمونه‌ای مشاهده شد که با کشت ترکیبی هر سه جدایه تخمیر شده بود. عصاره حاوی پپتید نمونه‌های شیر تخمیر شده با کشت‌های ترکیبی (S23 و S123) پس از تخمیر با MIC برابر ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از بالاترین فعالیت ضد کپکی برخوردار بودند. پس از ۷ روز نگهداری خاصیت ضدکپکی نمونه S1 در مقابل *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و نمونه S2 در مقابل *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب با MIC برابر ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزایش یافت. همچنین همه نمونه‌های شیر تخمیری (زمان صفر) خاصیت ضد مخمری را بعد از ۷۲ ساعت با MIC برابر با ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حفظ کردند که پس از ۷ روز نگهداری، این ویژگی در شیرهای تخمیر شده با کشت منفرد افزایش یافت.

*مسئول مکاتبه: amoayedi@gau.ac.ir

نتیجه‌گیری: در طی تخمیر، بیشترین فعالیت پروتئولیزی در نمونه‌ای اتفاق افتاد که توسط ترکیبی از سه باکتری لاکتیکی تخمیر شده بود. عصاره حاوی پپتید همه نمونه‌های شیر تخمیر شده دارای خاصیت ضد کپکی و ضد مخمری بودند و اغلب نمونه‌ها در زمان صفر دارای MIC برابر ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند که البته در برخی از نمونه‌ها، ۷ روز پس از نگهداری خاصیت ضد قارچی افزایش یافت. در این پژوهش احتمال می‌رود بخشی از تأثیر ضدقارچی شیرهای تخمیری به دلیل پروتئولیز و محتوای پپتیدی آن‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی: لاکتیک اسید باکتری‌ها، پروتئولیز، شیر تخمیری، خاصیت ضدقارچی

مقدمه

برخی کپک‌ها و مخمرها می‌توانند در شیر و فراورده‌های لبنی به عنوان یک محیط مغذی رشد نموده و ایجاد فساد کنند. این ارگانیسم‌ها می‌توانند لاکتوز را تخمیر نموده، از لاکتات استفاده کنند، لیپیدها و پروتئین‌ها را هیدرولیز کنند و قادر هستند در یخچال نیز رشد کنند. قارچ‌های فاسد کننده مواد غذایی عامل ایجاد گاز، الکل و ترکیبات بد بو هستند که نهایتاً منجر به نقایص طعمی و بافتی و صدمات اقتصادی می‌شوند. علاوه بر این برخی از قارچ‌ها توکسین تولید می‌کنند که برای سلامتی مصرف‌کنندگان مضر است (۲۶). برای پیشگیری از فساد قارچی، نگه‌دارنده‌های شیمیایی متعددی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با این حال، افزایش مقاومت قارچ‌ها به نگه‌دارنده‌های شیمیایی، تمایل مصرف‌کنندگان به فراورده‌های سالم و طبیعی و تغییر مقررات نظارتی موجب شده است صنایع و مراکز تحقیقاتی به سمت تولید نگه‌دارنده‌های جدیدتر ازجمله کشت‌های حفاظتی گام بردارند (۳۲).

لاکتیک اسید باکتری‌ها کاندیدای خوبی برای حفاظت زیستی مواد غذایی به شمار می‌روند، زیرا به صورت طبیعی در بسیاری از محصولات تخمیری حضور داشته و ایمن هستند. در مطالعات مختلف، گونه‌های مختلفی از لاکتیک اسید باکتری‌های فعالیت ضد قارچی نشان داده‌اند (۲۱ و ۱۱). گرز و همکاران (۲۰۱۳) از مجموع ۹۰ جدایه لاکتیک اسید باکتری، ۱۰ جدایه را به‌دلیل فعالیت ضد قارچی مطلوب انتخاب و مورد بررسی قرار دادند. در روماند فاقد سلول آنها، اسیدهای لاکتیک، استیک و فنیل لاکتیک به عنوان متابولیت‌های دارای فعالیت ضد قارچی شناسایی شدند و مشاهده شد پس از خنثی سازی روماند با قلیا، فعالیت ضد قارچی نیز از بین می‌رود (۱۰). در سایر مطالعات نیز این ترکیبات به همراه روترین و اسیدهای چرب به عنوان عوامل اصلی مهارکننده رشد قارچ‌ها شناسایی شده‌اند (۳، ۲۷ و ۲۲). این در حالی است که مکانیسم‌هایی که به واسطه آنها، این مولکول‌ها رشد کپک را مهار می‌کنند هنوز به‌طور کامل شناسایی نشده است (۳).

در سال‌های اخیر، پپتیدهای ضد میکروبی مختلفی از پروتئین‌های غذایی تولید و معرفی شده‌اند. با وجودی که تولید پپتیدها و هیدرولیز شده‌های پروتئینی ضد باکتریایی در مطالعات متعددی بررسی شده‌اند اما هیدرولیزشده‌های دارای فعالیت ضد قارچی کمتر مورد مطالعه قرارگرفته‌اند. لیو و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و برومولین، پروتئین نوعی صدف را هیدرولیز نمودند و پپتیدهایی تولید کردند که قادر بودند به نحو مؤثری *بوتیریتیس سینرا* و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* را مهار کنند (۱۹). کوریا و همکاران (۲۰۱۱) نیز کازئینات شیر بز را به منظور تولید پپتیدهای زیست فعال با استفاده از پروتئاز به‌دست آمده از یکی از گونه‌های *باسیلوس* هیدرولیز نمودند و گزارش دادند مخلوط پپتیدی به‌دست آمده پس از ۳ ساعت هیدرولیز قادر بود رشد *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* را مهار کند (۲). در اغلب پژوهش‌های صورت گرفته برای تولید پپتیدها و هیدرولیز شده‌های پروتئینی ضد میکروبی از آنزیم‌های پروتئاز جهت هیدرولیز پروتئین استفاده شده است. از سوی دیگر، به جز اسیدهای آلی اطلاعات اندکی در مورد فعالیت ضد قارچی سایر متابولیت‌های لاکتیک اسید باکتری‌ها در دسترس است. در مطالعه حاضر، علاوه بر بررسی رشد و فعالیت پروتئولیتیکی چند جدایه از لاکتیک اسید باکتری‌های پروتئولیتیک به صورت کشت‌های منفرد یا ترکیبی در شیر، فعالیت ضد قارچی عصاره خام پپتیدی به‌دست آمده از نمونه‌های مختلف شیر تخمیر شده مورد مطالعه قرار گرفته است. همچنین تغییر

محتوای پپتیدی و فعالیت ضد قارچی عصاره پپتیدی پس از هفت روز نگهداری در یخچال نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های باکتری‌های لاکتیکی و شرایط کشت: *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*[1]، و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس*[2] قبلاً به‌عنوان نژادهای منتخب پروتئولیتیک به ترتیب از شیر خام بز و گاو جداسازی و پس از شناسایی مولکولی در بانک میکروبی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ذخیره شده بودند (طرح پژوهشی با شناسه ۳۳-۳۵۴-۹۵). *لاکتوباسیلوس روتری*[3] (جدا شده از شیر گوسفند) نیز علیرغم فعالیت پروتئولیتیک پایین به عنوان کشت تلقیحی مورد استفاده قرار گرفت. کشت‌های خشک شده انجمادی جدایه‌های لاکتیکی به محیط MRS مایع استریل منتقل و تحت شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. حداقل با دو پاساژ متوالی در محیط مذکور، کشت‌ها فعال شدند.

قارچ‌های مورد استفاده در این پژوهش و شرایط کشت: کپک‌ها و مخمر مورد استفاده از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی، واقع در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. در این پژوهش از کپک‌های *آسپرژیلوس نایجر* PTCC 5012 و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* PTCC 5031 و مخمر *کاندیدا آلبیکنس* PTCC 5027 جهت انجام آزمون‌های ضد قارچی استفاده گردید. کپک‌ها در محیط PDB در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و مخمر در محیط YMB (گلوکز ۱۰ گرم، پپتون ۵ گرم، عصاره مخمر ۳ گرم، عصاره مالت ۳ گرم، آب مقطر ۱ لیتر) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند.

تولید شیر تخمیرشده و تهیه عصاره خام پپتیدی: شیر بدون چربی بازسازی شده ۱۲ درصد (وزنی/حجمی) در دمای ۱۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد و تا دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. پس از آن ۲ درصد (حجمی-حجمی) از کشت فعال هر جدایه یا ترکیبی از جدایه‌ها به شیر استریل تلقیح گردید و تا رسیدن pH به حدود ۴/۵ (۱۳)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس شیر تخمیرشده به‌مدت یک هفته در یخچال نگهداری گردید. برای تهیه روماند حاوی پپتید محلول در آب که از این پس عصاره خام پپتیدی نامیده می‌شود، نمونه‌های تخمیر شده با سرعت ۸۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و بخش روماند پس از فیلتر شدن با فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر، در خشک‌کن انجمادی خشک گردید و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۷). تیمارهای تخمیری تولیدی عبارت بودند از: شیر تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* با کد S1، شیر تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس روتری* با کد S2، شیر تخمیر شده با *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* با کد S3، شیر تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *لاکتوباسیلوس روتری* با کد S12، شیر تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* با کد S13، شیر تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* با کد S23 و شیر تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *لاکتوباسیلوس روتری* و

۱. *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*
۲. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
۳. *Lactobacillus reuteri*

لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه *لاکتیس* با کد S123. جهت لحاظ نمودن اثر اسید در آزمون‌ها، یک نمونه شیر اسیدی شده کنترل با افزودن لاکتیک اسید به شیر استریل تا رسیدن pH آن به ۴/۶ تهیه شده و با کد CAM مورد استفاده قرار گرفت. یک نمونه شیر استریل نیز بدون انجام تخمیر و بدون افزودن اسید به‌عنوان شیر کنترل تهیه گردید که با کد L نام‌گذاری شد.

اندازه‌گیری محتوای پپتیدی: برای اندازه‌گیری میزان پپتید در عصاره خام پپتیدی مشابه با روش منتشر شده توسط ریزلو و همکاران (۲۰۰۵) از غلظت‌های مختلف تریپتون (۰/۵-۰/۰۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای رسم منحنی استاندارد و تحلیل معادله رگرسیونی به‌دست آمده استفاده شد (۲۸). برای این منظور ۲/۵ میلی‌لیتر از شیر تخمیر شده (پس از تخمیر و پس از هفت روز نگهداری) با ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۵ درصد مخلوط شد و پس از گذشت ۱۰ دقیقه در دمای محیط، با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. از روماند حاصله پس از صاف شدن با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ جهت اندازه‌گیری محتوی پپتیدی استفاده گردید. برای اندازه‌گیری میزان پپتید، ۲۰۰ میکرولیتر از فاز روماند مذکور یا غلظت‌های مختلفی از تریپتون با ۳ میلی‌لیتر از معرف OPA مخلوط شد و پس از گذشت ۲ دقیقه، جذب نمونه در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای پپتیدی در عصاره به‌دست آمده از نمونه‌های تخمیرشده به‌صورت معادل تریپتون محاسبه شد.

فعالیت ضد کپکی عصاره خام پپتیدی به‌دست آمده از شیر تخمیر شده: این آزمون مشابه با روش توصیف شده توسط سنگمانی و هانگترکر (۲۰۱۴) با اندکی تغییرات انجام شد (۲۹). اسپورهای کپکی پس از شمارش در محیط PDB به صورت سریالی تا غلظت 10^5 spore/mL رقیق شدند. ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور کپک و ۱۸۰ میکرولیتر از عصاره خام پپتیدی رقیق شده در محیط PDB (در غلظت‌های ۸۰-۴۰-۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر یک از چاهک‌ها در پلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده شد. مقادیر MIC[4] بعد از گذشت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گزارش گردید. مقادیر MFC[5] نیز با لکه‌گذاری ۱۰ میکرولیتر از چاهک MIC روی محیط PDA انجام شد. کنترل‌ها شامل کنترل استریلیزاسیون (چاهک حاوی ۲۰۰ میکرولیتر PDB)، کنترل منفی شامل چاهک حاوی ۲۰۰ میکرولیتر PDB حاوی عصاره، کنترل مثبت شامل چاهک حاوی ۱۸۰ میکرولیتر PDB و ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور کپک و چاهک حاوی ۱۸۰ میکرولیتر PDB حاوی آمفوتریسین (gμ ۴) (۲۵) و ۲۰ میکرولیتر اسپور کپک به‌عنوان چاهک کنترل عدم رشد در نظر گرفته شدند.

فعالیت ضد مخمری عصاره خام پپتیدی به‌دست آمده از شیر تخمیر شده به روش کدورت سنجی: برای این آزمون از روش نیانزی و همکاران (۲۰۱۴) با اندکی تغییرات استفاده شد (۲۴). به‌طور خلاصه، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمر (10^5 cfu/mL) و ۱۸۰ میکرولیتر از عصاره خام پپتیدی رقیق شده در YMB (در غلظت‌های ۸۰-۴۰-۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک افزوده شد. سپس میکروپلیت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. مقادیر MIC و MFC پس 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 در نظر گرفته شد.

1. Minimum Inhibition Concentration
2. Minimum Fungicidal Concentration

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS بر پایه طرح کاملا تصادفی انجام شد. سپس برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید و نمودارها به کمک نرم افزار اکسل ۲۰۱۳ رسم شدند.

نتایج و بحث

محتوای پپتیدی در شیر تخمیرشده و تغییرات آن پس از نگهداری: در این مطالعه به منظور تولید پپتیدهای زیست فعال در شیر از باکتری‌هایی با فعالیت پروتئولیتیکی مناسب استفاده گردید. محتوای پپتیدی نمونه‌ها به‌صورت معادل تریپتون اندازه‌گیری شد که در جدول ۱ نشان داده شده است. چنانچه دیده می‌شود در تمام نمونه‌های تخمیرشده در مقایسه با نمونه شاهد افزایش معنی‌داری در پروتئولیز صورت گرفته است که منجر به تجمع پپتیدها در فاز محلول در آب شده است. بیشترین محتوای پپتیدی در انتهای تخمیر (زمان صفر) به میزان ۶/۶۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر در نمونه S123 مشاهده شد که با کشت ترکیبی سه‌گانه تخمیر شده بود. در همین زمان (صفر) کمترین فعالیت پروتئولیتیک نیز در نمونه S2 (شیر تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس روتری*) مشاهده شد که حاوی ۲/۹ میلی‌گرم پپتید در هر میلی‌لیتر بود. علاوه بر این در نمونه‌های تخمیر شده با کشت انفرادی، *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* به‌طور معنی‌داری فعالیت پروتئولیتیک بالاتری (۶/۵ میلی‌گرم پپتید در هر میلی‌لیتر) نسبت به *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* (۴/۸ میلی‌گرم پپتید در میلی‌لیتر) نشان داد. در تطابق با نتایج مطالعه حاضر در مورد کشت‌های منفرد، نیلسن و همکاران (۲۰۰۹) در پژوهشی بر روی ۴ سویه از لاکتیک اسید باکتری‌ها شامل *لاکتوکوکوس لاکتیس*، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در شیر تخمیر شده نشان دادند که *لاکتوکوکوس لاکتیس* نسبت به سایر لاکتیک اسید باکتری‌های مورد استفاده فعالیت پروتئولیتیک بالاتری داشت و در اثر فعالیت باکتری مذکور در شیر بیشترین میزان پپتیدهای دارای خواص فیزیولوژیک تولید شد (۲۳). نتایج حاصل از یک پژوهش دیگر در بررسی ویژگی‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* در پنیر چدار نشان داد که به علت فعالیت پروتئولیکی بالای باکتری مذکور زمان رسیدن کوتاه‌تر شده و همچنین محتوای پپتیدی در مقایسه با نمونه شاهد افزایش قابل توجهی پیدا کرده است. باکتری‌ها مقدار کمی از پپتیدهای تشکیل شده از هیدرولیز پروتئین‌ها را مورد مصرف قرار می‌دهند و بخش اعظم پپتیدها در محیط باقی می‌ماند که قادر خواهند بود اثرات فیزیولوژیک نشان دهند (۱۴).

پس از هفت روز نگهداری در یخچال مشاهده شد که میزان پپتید در نمونه‌های S1 و S13 افزایش و در نمونه‌های S3، S23 و S123 کاهش معنی‌داری داشته است. بیشترین میزان پپتید در عصاره پپتیدی پس از هفت روز نگهداری مربوط به نمونه S1 (۶/۳۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و S13 (۵/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و کمترین میزان مربوط به نمونه S2 (۳/۴۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود. کاهش محتوای پپتیدی در طی نگهداری به مدت هفت روز با اغلب مطالعات قبلی ازجمله نتایج چاوز-لوپز و همکاران (۲۰۱۴) بر روی شیرهای تخمیر شده با کشت‌های میکروبی مختلف (۱)، دانکور و همکاران (۲۰۰۶) بر روی چند نمونه ماست پروبیوتیک (۶) و نتایج جورگالا و همکاران (۱۹۹۷) در مورد ماست‌های سنتی یونان (۹) در تناقض است. کاهش میزان پپتیدها و آمینواسیدها پس از هفت روز می‌تواند تا حدی به‌دلیل مصرف شدن آن‌ها توسط سلول‌های زنده جهت رشد سلولی باشد.

جدول ۱ – محتوای پپتیدی شیرهای تخمیر شده پس از پایان تخمیر و پس از هفت روز نگهداری در یخچال

Table 1. Peptide content in the fermented milk samples after fermentation and 7 days storage

محتوای پپتیدی Peptide Content (mg/ml)	pH	زمان (روز) Time (day)	Code
4.8 cd	4.6	0	S1
6.34 ab	4.4	7	
2.9 fg	4.6	0	S2
3.41 efg	4.3	7	
6.5 a	4.6	0	S3
3.45 efg	4.4	7	
4.1 ed	4.6	0	S12
3.67 ef	4.4	7	
4.04 ed	4.6	0	S13
5.6 bc	4.4	7	
5.05 Cd	4.6	0	S23
3.61 ef	4.3	7	
6.62 a	4.6	0	S123
4.41 de	4.3	7	
2.41 fg	4.6	0	CAM
2.41 fg	4.6	7	
1.8 h	4.6	0	L
1.8 h	4.6	7	

* محتوای پپتیدی بصورت معادل تریپتون (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) محاسبه شده است.

Peptide contents were calculated as tryptone (mg/ml) equivalents.

در نتایج مربوط به محتوای پپتیدی، حروف غیر مشترک در هر ستون نشانگر تفاوت معنی‌داری است (P<۰/۰۵).

For the results of peptide content, different letters in each column indicate a significant difference (P<0.05).

S1، S2 و S3 به‌ترتیب نشان‌دهنده نمونه‌های تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*، *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه لاکتیس می‌باشند. S12: نمونه تخمیرشده با *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *لاکتوباسیلوس روتری*، S13: نمونه تخمیرشده با *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه لاکتیس S23: نمونه تخمیرشده با *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه لاکتیس و *لاکتوباسیلوس روتری*، S123: نمونه تخمیرشده با *لاکتوباسیلوس* دلبروکی زیرگونه *بولگاریکوس*، *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه لاکتیس.

S1, S2 and S3 represent the samples fermented with *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *L. reuteri*, and *L. lactis* subsp. *lactis*, respectively. S12: نمونه fermented with *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* and *L. reuteri*, S13: fermented with *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* and *L. lactis* subsp. *lactis*, S23: fermented with *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. reuteri*, S123: fermented with *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus, L. reuteri* and *L. lactis* subsp. *lactis*.

بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره پپتیدی با تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MFC): با توجه به نتایج جدول ۲ و ۳ دیده می‌شود عصاره‌های حاوی پپتید حاصل از تخمیر شیر در مقایسه با شیر اسیدی شده در مقابل کپک‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و مخمر *کاندیدا آلبیکنس* خاصیت مهارکنندگی و کشندگی داشتند که شدت فعالیت بسته به نوع کشت آغازگر و میکروارگانیسم هدف متغیر بود. چنانچه در جدول ۲ دیده می‌شود، عصاره پپتیدی اغلب نمونه‌های تخمیرشده در زمان صفر (پس از تخمیر) MIC برابر با ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در برابر رشد دو کپک مذکور داشتند، در حالی که نمونه‌های S23 و S123 دارای MIC برابر با ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نمونه S2 دارای MIC برابر با ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند. با بررسی MIC نمونه‌ها پس از هفت روز نگهداری مشاهده شد که به‌جز شیرهای تخمیر شده S1 و S2، فعالیت ضد کپکی شیرهای تخمیر شده تغییری نکرد.

همچنین با توجه به جدول ۳، فعالیت ضد مخمری نمونه‌های S3، S12 و S13 پس از تخمیر (زمان صفر) با MIC برابر با ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در طول ۷۲ ساعت تغییری نکرد در حالی که نمونه‌های S1 و S2 تا ۴۸ ساعت با MIC برابر با ۲۰ میلی‌گرم

بر میلی‌لیتر و نمونه‌های S23 و S123 تا ۲۴ ساعت با MIC برابر با ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فعالیت ضد مخمری خود را حفظ کردند اما پس از آن تا پایان ۷۲ ساعت فعالیت ضد مخمری آن‌ها کاهش یافت و دارای MIC برابر با ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند. پس از ۷ روز نگهداری فقط شیرهای تخمیر شده با کشت‌های منفرد فعالیت ضد مخمری آن‌ها افزایش یافت و دارای MIC برابر با ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند.

عصاره حاوی پپتید تمام نمونه‌های شیر تخمیر شده (به صورت تازه و نیز پس از ۷ روز نگهداری) دارای MFC در مقابل کپک‌ها و مخمر مورد مطالعه بودند. در میان تیمارها (زمان صفر)، نمونه‌های S23 و S123 دارای بالاترین اثر کشندگی در برابر *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* با MFC برابر با ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند. پس از ۷ روز نگهداری، MFC اکثر نمونه‌های شیر تخمیر شده به‌جز نمونه‌های S3 و S12 در برابر *آسپرژیلوس نایجر* کاهش یافت که نشان از افزایش خاصیت کشندگی دارد. همچنین در برابر *کاندیدا آلبیکنس* نیز، در انتهای تخمیر، همه نمونه‌ها به‌جز نمونه‌های S23 و S12 و S123 در طول ۷۲ ساعت با MFC برابر با ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اثر کشندگی بودند. پس از ۷ روز نگهداری، تنها در مورد نمونه S13 خاصیت مخمرکشی تغییری نکرد، در حالی که در اغلب نمونه‌ها خاصیت مخمرکشی افزایش یافت.

جدول ۲- فعالیت ضد کپکی عصاره پپتیدی به‌دست آمده از شیرهای تخمیر شده

Table 2. Anti-mold activities of peptide extracts obtained from fermented milk

کد نمونه Sample code	زمان (روز) Time (Days)	کپک Mold			
		پنی‌سیلیوم اکسپانسوم *Penicillium expansum*		*آسپرژیلوس نایجر* *Aspergillus niger*	
		MFC	MIC	MFC	MIC
S1	0	40	40	80	40
	7	40	20	40	40
S2	0	40	40	80	80
	7	40	20	40	40
S3	0	40	40	40	40
	7	40	40	40	40
S13	0	80	40	80	40
	7	40	40	40	40
S12	0	40	40	40	40
	7	40	40	40	40
S23	0	40	20	20	20
	7	20	20	20	20
S123	0	40	20	20	20
	7	40	20	20	20
شیر اسیدی شده	0	-	-	-	-
Acidified milk (AM)	7	-	-	-	-

*مدت زمان نگهداری شیر تخمیر شده پس از اتمام فرایند تخمیر. **: MIC و MFC به‌ترتیب نشان‌دهنده حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی پپتیدها در برابر مخمر است.

*The storage time for the fermented milk in the refrigerator. **: MIC and MFC show the minimum inhibitory concentration and the minimum fungicide concentration of peptides against tested yeast.

جدول ۳- فعالیت مهارکنندگی عصاره پپتیدی به‌دست آمده از شیرهای تخمیر شده در برابر *کاندیدا آلبیکنس*

Table 3. The inhibitory activities of peptide extracts obtained from fermented milks against *Candida albicans*

کد نمونه Sample code	*زمان (روز) Time (days)	مدت زمان گرمخانه‌گذاری (ساعت) Incubation time (h)					
		۲۴ ساعت 24 h		۴۸ ساعت 48 h		۷۲ ساعت 72 h	
		MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC
S1	0	40	20	40	20	40	40
	7	20	20	20	20	40	20
S2	0	40	20	40	20	40	40
	7	20	20	40	20	40	20
S3	0	40	40	40	40	40	40
	7	20	20	20	20	40	20
S13	0	40	40	40	40	40	40
	7	40	40	40	40	40	40
S12	0	40	40	80	40	80	40
	7	40	20	40	40	40	40
S23	0	40	20	80	40	80	40
	7	40	40	40	40	80	40
S123	0	20	20	40	20	80	40
	7	40	40	40	40	40	40
شیر اسیدی شده	0	-	-	-	-	-	-
Acidified milk (AM)	7	-	-	-	-	-	-

*مدت زمان نگهداری شیر تخمیر شده پس از اتمام فرایند تخمیر. **: MIC و MFC به‌ترتیب نشان‌دهنده حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی پپتیدها در برابر مخمر است.

*The storage time for the fermented milk in the refrigerator. **: MIC and MFC show the minimum inhibitory concentration and the minimum fungicide concentration of peptides against tested yeast.

مطالعاتی در زمینه فعالیت ضد کپکی و ضد مخمری در فراورده‌های لبنی انجام شده است. از جمله خمیری و همکاران (۱۳۹۵) به بررسی فعالیت *لاکتوباسیلوس برویس* و *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از چال در مقابل مخمرهای عامل فساد در دوغ مانند *ساکارومایسس سرویزیه*، *کلیورومایسس مارکسیانوس* و *رودوترولا گلوتینیس* پرداختند. آن‌ها در طی ۱۵ روز نگهداری دوغ مشاهده کردند که باکتری‌های لاکتیکی مورد آزمون، توانستند میزان مخمر *رودوترولا گلوتینیس* را حدود یک سیکل لگاریتمی کاهش دهند اما قادر نبودند رشد و فعالیت دو مخمر دیگر را در دوغ مهار کنند (۱۵). نویسندگان نتیجه گرفتند حساسیت متفاوت مخمرهای مورد آزمون می‌تواند به دلیل قابلیت آن‌ها در تغییر متابولیسم سلول در مواجه‌شدن با شرایط اسیدی باشد (۳۳). محققان دیگر نیز فعالیت ضدقارچی را به اسیدهای آلی نسبت داده‌اند. به‌طوری‌که در تحقیقات انجام شده اثر ضدقارچی آب پنیر تخمیر شده با دانه‌های کفیر را به اسیدهای آلی مانند لاکتیک اسید و استیک اسید نسبت داده‌اند (۲۰). با این وجود در پژوهش حاضر، مقایسه فعالیت ضدقارچی نمونه‌های شیر تخمیرشده با عدم مشاهده چنین اثری توسط شیر اسیدی شده کنترل، نشان می‌دهد احتمالا بخشی از فعالیت ضدقارچی به پپتیدهای تولید شده در اثر فعالیت پروتئازی لاکتیک اسید باکتری‌ها روی پروتئین‌های شیر مرتبط باشد که البته نوع و میزان

پپتید تولید شده بسته به گونه و نژاد میکروبی و پروتئازها و پپتیدازهای آن‌ها متفاوت است (۱۲و ۱۸). اما نمی‌توان رابطه مستقیمی بین میزان پپتید تولید شده و خاصیت ضدقارچی در نتایج یافت. بنابراین احتمال می‌رود علاوه بر پپتیدها بخشی از خاصیت ضدقارچی ناشی از سایر متابولیت‌های غیر پپتیدی نیز باشد. در مطالعه استروم و همکاران (۲۰۰۲) که از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان کشت حفاظتی در ماست استفاده شده بود، دو دی‌پپتید حلقوی به عنوان مهمترین عوامل ضد قارچی معرفی شدند که گفته شد مکانیسم اثر آن‌ها احتمالا نوعی اثر ثانویه (تولید آن‌ها از پدیده ادراک حد نصاب ناشی می‌شود) یا کاملا ناشناخته است (۳۱). در این میان نمی‌توان تأثیر سینرژیستی اسیدهای آلی با پپتیدها یا سایر مولکول‌های ضدقارچی تولید شده توسط لاکتیک اسید باکتری‌ها را در مهار رشد قارچ‌ها نادیده گرفت. در این راستا تراپچوا و همکاران (۲۰۱۴) خاصیت ضد کپکی ۶ نژاد *لاکتوباسیلوس برویس* در مقابل ۶ کپک را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که شیرهای تخمیر شده با نژادهای *لاکتوباسیلوس برویس* KR3، KR4 و KR51 رشد *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس آواموری* و *پنی‌سیلیوم کلاویفرم* را به طور کامل مهار کردند. البته در نمونه تخمیر شده با نژاد KR3، رشد ضعیفی از *آسپرژیلوس نایجر* مشاهده شد. محققان بر اساس تحقیقات خود فعالیت ضد کپکی نژادهای مختلف *لاکتوباسیلوس برویس* را به تولید ترکیبات پروتئینی و اسیدهای آلی و اثر سینرژیستی بین آن‌ها نسبت دادند و بیان داشتند که طیف گسترده این فعالیت در مقابل ۶ کپک مورد آزمون به نژاد بستگی دارد (۳۲).

عصاره حاوی پپتید نمونه‌های شیر تخمیر شده با کشت‌های ترکیبی (S23 و S123) در مقایسه با نمونه‌های ترکیبی دیگر (S12 و S13) و کشت‌های منفرد، با دارا بودن MIC برابر ۲۰ میلی‌گرم بر میلی-لیتر، بالاترین فعالیت ضد کپکی را نشان دادند. فرناندز و همکاران (۲۰۱۷) نیز طی تحقیقات خود به نتایج مشابهی دست یافتند. آنها گزارش کردند که استفاده از *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LC705 و *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* زیرگونه *شرمانی* به‌صورت جداگانه در تخمیر شیر تأثیری بر مهار *پنی‌سیلیوم کرایزوژنوم* نداشته است اما اثرات سینرژیستی مشاهده شده در اثر هم کشت کردن این دو باکتری موجب مهار رشد کپک مذکور در شیر به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد شده است. این در حالی بود که محققان دریافتند در میان چندین نوع هم کشت کردن باکتری‌های لاکتیکی مختلف، فقط سه نوع ترکیب باکتریایی تأثیر معنی‌داری بر مهار رشد کپک مذکور را داشت و بقیه اثرات متقابل بین باکتری‌های لاکتیکی هیچ گونه تأثیری بر مهار رشد کپک نداشتند. محققان علاوه بر تولید اسیدهای آلی، تولید ترکیبات دیگری با فعالیت ضدقارچی را علت مهار رشد پنی-سیلیوم *کرایزوژنوم* در هم کشت کردن برخی از باکتری‌ها اعلام کردند (۸).

در تحقیقی دیگر، لیوا سالس و همکاران (۲۰۱۸) اثر ضدقارچی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* L244 در ترکیب با *لاکتوباسیلوس هاربیننسیس* L172 یا *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* CIRM-BIA1113 را در ماست و پنیر گزارش کردند. آن‌ها مشاهده کردند به دلیل تولید مقادیر بالاتر و متنوع‌تری از ترکیبات ضدقارچی و اثر سینرژیستی بین آن‌ها در کشت‌های ترکیبی در مقایسه با کشت‌های منفرد، فعالیت ضدقارچی کشت‌های ترکیبی بهتر بوده است (۱۶).

دلاون و همکاران (۲۰۱۳) نیز فعالیت ضدقارچی ۱۱ نژاد *لاکتوباسیلوس* (نژادهای متعلق به *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *لاکتوباسیلوس زئی* و *لاکتوباسیلوس هاربیننسیس*)

جدا شده از شیر گاو و شیر بز را در شیر و ماست مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها گزارش کردند که حساس‌ترین قارچ‌ها به اسید مهار نشدند در حالی که مهار قارچ‌هایی با حساسیت کم به اسید مشاهده شد. محققان نتیجه گرفتند که احتمالا مولکول‌های ضدقارچی دیگری غیر از اسیدهای آلی ممکن است در خاصیت مهارکنندگی نقش داشته باشند (۵).

به‌طور کلی با توجه به تحقیقات صورت گرفته فعالیت ضدقارچی می‌تواند به دلیل تولید ترکیبات با وزن مولکولی پایین، ترکیبات پروتئینی، پپتیدها و اسیدهای آلی مانند اسیدهای چرب هیدروکسیل باشد (۴ و ۱۷). علاوه براین، متابولیت‌های ضدقارچی مختلفی مانند ۲-پیرولیدون-۵-کربوکسیلیک اسید، ۳-فنیل لاکتیک اسید، هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید و سوکسینیک اسید در مقادیر کم تولید می‌شوند (۳۰)، که حتی مقدار آن‌ها به حداقل غلظت مورد نیاز برای مهار رشد قارچ نمی‌رسد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت فعالیت ضدقارچی لاکتیک اسید باکتری‌ها به دلیل تأثیر سینرژیستی میان ترکیبات مختلف است که توسط اسیدهای آلی تولید شده مانند لاکتیک اسید و استیک اسید تشدید می‌شود (۴).

نتیجه‌گیری کلی

در طول تخمیر، در شیر تلقیح شده با سه باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*، *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* (S123) بیشترین میزان پروتئولیز رخ داد و بالاترین محتوای پپتیدی به دست آمد. پس از هفت روز نگهداری در یخچال مشاهده گردید که محتوای پپتیدی در برخی از نمونه‌ها کاهش یافته است. شیرهای تخمیر شده توسط کشت‌های ترکیبی (نمونه‌های S23 و S123) نسبت به شیرهای تخمیر شده با کشت‌های منفرد و یا ترکیبی دیگر فعالیت ضدکپکی بیشتری را نشان دادند. هر چند در مورد فعالیت ضدمخمری تفاوت چشمگیری بین تیمارها مشاهده نشد و فقط دو نمونه S1 و S2 توانستند تا پایان ۴۸ ساعت خاصیت ضدمخمری را با MIC برابر با ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حفظ کنند. در مجموع چنین استنباط می‌شود که فرایند پروتئولیز و افزایش محتوای پپتیدی می‌تواند در اعمال بخشی از خاصیت ضد قارچی شیرهای تخمیر شده نقش داشته باشد.

منابع

1. Chaves-López, C., Serio, A., Paparella, A., Martuscelli, M., Corsetti, A., Tofalo, R., and Suzzi, G. 2014. Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. Food microbiology, 42: 117-121.
2. Corrêa, A.P.F., Daroit, D.J., Coelho, J., Meira, S.M., Lopes, F.C., Segalin, J., and Brandelli, A. 2011. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. Journal of the Science of Food and Agriculture, 91(12): 2247-2254.
3. Crowley, S., Mahony, J., and van Sinderen, D. 2013. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. Trends in Food Science & Technology, 33(2): 93-109.
4. Dallagnol, A.M., Catalán CAN, Mercado, M.I., Font de Valdez, G., and Rollán, G.C. 2011. Effect of biosynthetic intermediates and citrate on the phenyllactic and hydroxyphenyllactic acids production by *Lactobacillus plantarum* CRL 778. Journal of Applied Microbiology, 111: 1447-1455.
5. 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.

6. Donkor, O., Henriksson, A., Vasiljevic, T., and Shah, N.P. 2006. Effect of acidification of probiotics in yoghurt during cold storage. International Dairy Journal, 16(10): 1181-1189.
7. Donkor, O., Henriksson, A., Vasiljevic, T., and Shah, N.P. 2007. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. Le Lait, 87(1): 21-38.
8. 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.
9. Georgala, A.K., Tsakalidou, E., Kandarakis, I., and Kalantzopoulos, G. 1997. An Index of Proteolysis Degree in Ewes' Milk and Ewes' Milk Yoghurt, by single Strains and Combinations of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaricus*, Isolated from Traditional Greek Yogurt. Food Science and Technology International Tokyo, 3 (3): 259-263.
10. Gerez, C.L., Torres, M.J., De Valdez, G.F., and Rollán, G. 2013. Control of Spoilage Fungi by Lactic Acid Bacteria. Biological Control, 64 (3): 231-237.
11. Gisela, A.G., Barberis, C., Pascual, L., Dalcero, A., and Barberis, L. 2012. Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties. FEMS Microbiol Lett, 332: 27-33.
12. Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., and Addeo, F. 2000. Production of Angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. Applied and Environmental Microbiology, 66(9): 3898-3904.
13. ISIRI. 2009. Yogurt-Features and assay methods. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Number 695.
14. Juillard, V., Le Bars, D., Kunji, E.R., Konings, W.N., Gripon, J.C., and Richard, J. 1995. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. Applied and Environmental Microbiology, 61(8): 3024-3030.
15. Khomeiri, M., Esazadeh Razlighi, S., and Nasrollahzadeh, A. 2017. Investigation of anti-yeast activity of *Lactobacillus brevis* and *Enterococcus fascium* isolated from Chal (fermented camel milk) on yeast causing spoilage in Doogh. Iran Biosystem Engineering, 47(4): 643-649. (In Persian).
16. Leyva Salas, M., Thierry, A., Lemaître, M., Garric, G., Harel-Oger, M., Chatel, M., Lê, S., Mounier, J., Valence, F., and Coton, E. 2018. Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Combinations in Dairy Mimicking Models and Their Potential as Bioprotective Cultures in Pilot Scale Applications. Frontiers in Microbiology, 9: article 1787.
17. Li, H., Liu, L., Zhang, S., Uluko, H., Cui, W., and Liu, J. 2013. Potential use of *Lactobacillus casei* AST18 as bioprotective culture in yogurt. Food Control, 34: 675-680.
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. Liu, J.R., Chen, M.J., and Lin, C.W. 2005. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. Journal of agricultural and food chemistry, 53(7): 2467-2474.
20. 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.
21. 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.
22. Lynch, K.M., Pawlowska, A.M., Brosnan, B., Coffey, A., Zannini, E., Furey, A., McSweeney, P.L.H., Waters, D.M., and Arendt, E.K. 2014. Application of *Lactobacillus amylovorus* as an antifungal adjunct to extend the shelf-life of Cheddar cheese. International Dairy Journal, 34(1): 167-173.
23. Nielsen, M.S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K.I., and Otte, J. 2009. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. International Dairy Journal, 19(3): 155-165.
24. 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.
25. 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. Journal of Medical Microbiology, 58: 1454–1462.
26. Pitt, J.I., and Hocking, A.D. 2009. Fungi and Food Spoilage. Boston, MA: Springer.
27. Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N., and Penna, A.L.B. 2012. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: Characteristics and applications. Food Engineering Reviews, 4(2): 124-140.
28. Rizzello, C.G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M.D., and Zambonin, P.G. 2005. Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. Journal of Dairy Science, 88(7): 2348-2360.
29. 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.
30. Schwenninger, S.M., Lacroix, C., Truttmann, S., Jans, C., Spörndli, C., Bigler, L., and Meile, L. 2008. Characterization of low-molecular-weight antiyeast metabolites produced by a food-protective *Lactobacillus-Propionibacterium* coculture. Journal of Food Protection, 71: 2481-2487.
31. Strom, K., Sjogren, J., Broberg, A., and Schnurer, J. 2002. Lactobacillus plantarum MiLAB 393 Produces the Antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo(l-Phe-l-Pro) and Cyclo(l-Phe-trans-4-OH-l-Pro) and 3-Phenyllactic Acid. Applied and Environmental Microbiology, 68 (9): 4322-4327.
32. 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.
33. Yang, Y., Bastos, M., and Chen, K.Y. 1993. Effects of osmotic stress and growth stage on cellular pH and polyphosphate metabolism in Neurospora crassa as studied by 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta, 1179: 141-147.

EJFPP, Vol. 11 (2): 1-18
http://ejfpp.gau.ac.ir

Antifungal activities of fermented milks produced by single or co-cultures of proteolytic lactic acid bacteria

S. Loghman[1], A. Moayedi[2*], M. Mahmoudi[3], M. Khomeiri[4]
[1]M.Sc. Graduated, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[3]Ph.D. Graduated, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[4]Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: 2019/02/21; Accepted: 2019/04/29

Abstract

Background and objectives: In recent years, the use of lactic acid bacteria has expanded as protective cultures in the production of fermented products. A significant part of the antifungal activity of lactic acid bacteria is related to the metabolites produced by them, in particular the various organic acids. However, recently peptides and protein hydrolysates with antifungal activity have been produced. The aim of this study was to investigate the activity of isolates of proteolytic lactic acid bacteria in the production of fermented milk with antifungal properties.

Materials and methods: In this study, sterilized skim milk was inoculated with single and combined cultures of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus reuteri* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (2%, w/w) and fermented at 37 °C to reach the optimum pH 4.5-4.6. The peptide content and antifungal properties of fermented milk against *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* and *Candida albicans* were evaluated after fermentation and 7 days of storage in the refrigerator.

Results: According to the results, *Lactobacillus reuteri* showed the least proteolytic activity in milk and among all the samples, the highest peptide content was observed in the fermented sample by combined cultures of all three isolates, resulting in the production of 62.6 mg peptide per ml. Peptide-containing extract of fermented milk samples with combined cultures (S23 and S123) had the highest anti-mold activity with a MIC of 20 mg/ml. After 7 days of storage, the anti-mold property of sample S1 against *Penicillium expansum* and sample S2 against *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* increased with a MIC of 20 and 40 mg/ml, respectively. Also, all samples of fermented milk (zero time) retained anti-yeast properties after 72 h with a MIC of 40 mg/ml, which after 7 days of storage; this property was increased in fermented milk with single culture.

Conclusion: During fermentation, the most proteolytic activity occurred in the sample fermented by a combination of three lactic bacteria. Peptide-containing extract of all fermented milk samples had anti-mold and anti-yeast properties, and most of the samples had a MIC of 40 mg per ml at zero time, although in some samples increased antifungal properties after 7 days of storage. In this study, it is likely to be a part of the antifungal effect of fermented milks may be due to their peptides generated during proteolysis.

***Keywords*:** Lactic acid bacteria, Proteolysis, Fermented milk, Antifungal activity

*Corresponding author: amoayedi@gau.ac.ir