مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۴۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵ (ص۶۴۹-۶۴۳)

بررسی فعالیت ضد مخمری لاکتوباسیلوس برویس و انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از چال (شیر تخمیری شتر) بر مخمرهای عامل فساد مواد غذایی در دوغ

مرتضی خمیری[1]*، سمیرا عیسی‌زاده رازلیقی[2]، احمد نصرالله زاده[3]

۱. عضو هیئت علمی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد، میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳.دانش آموخته کارشناسی ارشد, میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۶- تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۷/۲۸)

چکیده

در مطالعات گوناگون تاثیر ضد میکروبی اسید لاکتیک باکتری‌ها به اثبات رسیده است. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر ضد مخمری باکتری‌های لاکتیکی جدا شده از چال به عنوان نگهدارنده زیستی در دوغ برای کاهش استفاده از نگهدارنده شیمیایی بوده است. برای این منظور فعالیت ضد مخمری لاکتوباسیلوس برویسو انتروکوکوس فاسیوم علیه ساکارومایسس سرویزیه، کلیورومایسس مارکسیانوس و رودوترولا گلوتینیس به روش دولایه و در مدل غذایی (دوغ) صورت گرفت. نتایج نشان داد لاکتوباسیلوس برویس و انتروکوکوس فاسیوم دارای بازدارندگی قوی علیه رودوترولا گلوتینیس می‌باشند. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که میزان مخمر رودوترولا گلوتینیس برخلاف دو مخمر مورد استفاده دیگر نسبت به نمونه کنترل در طی ۱۵ روز ماندگاری به میزان یک سیکل لگاریتمی کاهش یافته است. بنابراین می‌توان استفاده از جدایه‌های اسید لاکتیک باکتریایی بدست آمده از چال را به عنوان نگهدارنده زیستی به همراه نگهدارنده‌های شیمیایی به منظور کاهش مقدار آنها پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس برویس، انتروکوکوس فاسیوم، ضد مخمری، روش دولایه، دوغ

مقدمه

مخمر و کپک ارگانیسم‌های مهمی در فساد محصولات غذایی و سیستم‌های غذایی می‌باشند به طوری که سالیانه بالای ۵ تا ۱۰ درصد از تولیدات مواد غذایی جهان در نتیجه فساد بوسیله آن‌ها از دست می‌رود. همچنین فساد ایجاد شده توسط این ارگانیسم‌ها در صورتی ایجاد می‌شود که شرایط برای رشد باکتری‌ها از نظر pH، مواد مغذی، فعالیت آبی و اکسیژن نامطلوب باشد (Pitt and Hocking, 2009; Yang and Chang, 2010). دوغ نوشیدنی حاصل از تخمیر شیر می‌باشد که در گروه ماست هم‌زده با ویسکوزیته پایین طبقه بندی شده و حاوی مواد طعم دهنده، نمک و آب می‌باشد. همچنین با توجه به اسیدیته بالا در ماست، خامه ترش و دوغ، باکتری‌ها کمتر رشد کرده و لذا مخمرها و کپک‌ها میکروارگانیسم‌های عامل فساد اصلی این محصولات به شمار می‌آیند (Mayoral *et al*, 2005). بنابراین کاهش رشد کپک و مخمر در تولید و ذخیره‌سازی مواد غذایی از اهمیت بالایی برخوردار است که برای این منظور راه کار زیادی بکارگرفته شده است.

بنزوئیک اسید و بنزونات سدیم و بعد از آن ناتامایسین تولید شده توسط استرپتومایسس ناتالانسیس به عنوان عوامل ضد قارچ در صنعت غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند (Voulgari *et al*. 2010). اما نکته قابل توجهی که در سال‌های اخیر به طور جدی مطرح شده است، افزایش تعداد گونه‌های میکروبی مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد. قارچ ها نیز از این قاعده مستثنی نبوده و هر دوی قارچهای عامل پاتوژن انسانی و کپک‌های عامل فساد مواد غذایی و جیره‌های غذایی خوراک دام در حال مقاوم شدن به این نگهدارنده‌ها می‌باشند. علاوه بر این، مطالعات نشان داده است که مخمرها و کپک ها نه تنها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، بلکه به مواد نگهدارنده‌ای نظیر اسید سوربیک و اسیدهای بنزوئیک و همچنین به تیمارهای شیمیایی نظیر ترکیبات پاک کننده نیز از خود مقاومت نشان می‌دهند. نشان داده شده است که تعدادی از

* ایمیل نویسنده مسئول: khomeiri@gau.ac.ir

گونه‌های ساکارومایسس، زایگوساکارومایسس و پنی سیلیوم می‌توانند در حضور سوربات پتاسیم رشد کنند (Schnürer and Davidson, 2001; Voulgari *et al*. 2010 Magnusson, 2005). در تحقیقات دیگری از پنیرهای کریسنزا و پراوالان سویه‌های از پسیلومایسس واریوتی و مخمر دباریومایسس هانسئی که می‌توانند ترانس ۱-،۳- پنتا دی ان تولید کنند و باعث ایجاد بد طعمی در این محصولات شوند، جداسازی شده است (Ledenbach and Marshall, Sperber and Doyle, 2009; 2010). علاوه بر این ویلجونی و همکاران طی پژوهشی مخمرهـای زیادی از جملـه ساکارومایسس سروزیه، کلیورومایسس مارکسیانوس و رودوترولا گلوتنیس را به عنوان سویه‌های غالب از ماست فاسد شده جدا کردند (Viljoen *et al*, 2003).

در سال‌های اخیر با توجه به گسترش تمایل مصرف کنندگان به استفاده از نگهدارنده‌های زیستی (میکروارگانیسم‌ها یا متابولیت آن‌ها به منظور جلوگیری از فساد و افزایش مدت نگهداری مواد غذایی) منجربه افزایش تحقیقات در این زمینه شده است (Stiles, 1996). اسید لاکتیک باکتری‌ها به عنوان نگهدارنده‌های زیستی در این زمینه مورد توجه خاص قرار گرفته‌اند و قرن‌ها به عنوان آغازگر در صنعت مواد غذایی مورد استفاده واقع شده‌اند. علاوه براین بر اساس نتایج تحقیقاتی که در این زمینه انجام گرفته است، خاصیت ضد قارچی این باکتری‌ها به دلیل وجود، اسیدهای آلی (مانند اسید لاکتیک، اسید فرمیک، اسید استیک، اسید کاپروئیک، اسید فنیل لاکتیک)، کربن دی اکسید، پراکسید هیدروژن، دی استیل، اتانول، اسیدهای چرب هیدروکسیل، دی پپتیدهای حلقوی، ترکیبات پروتئینی، رئوترین و رئوتری‌سیلین، می‌باشد که بوسیله لاکتیک اسید باکتری‌ها تولید می‌شوند (Pawlowska *et al*, 2012). فعالیت ضد قارچی اسید لاکتیک باکتری‌ها در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است برای مثال Hassan & Bullerman (2008) تاثیر ضد قارچی لاکتوباسیلوس پاراکازئی[1] جدا شده از خمیر ترش در برابر فوزاریوم گرامینئاروم[2] و فوزاریوم پرولیفرتوم[3] را نشان دادند. در مطالعه‌ای دیگر گونه‌های لاکتو باسیلوس جدا شده از محیط‌های مختلف دارای فعالیت ضد قارچی در برابر آسپرژیلوس فومیگاتوس[4]، فوزاریوم اسپوروتریکوایدیس[5] و رودوترولا موسی لاجینوس[6] ولی در برابر پنی سیلیوم روکفورتی[7] و کلیورومایسس مارکسیانوس فاقد اثر مهارکنندگی بودند (Magnusson *et al*, 2003). علاوه بر آن مطالعاتی نیز در مورد فعالیت ضد قارچی اسیدلاکتیک باکتری‌ها در مدل غذایی به عنوان نگهدارنده زیستی انجام شده است برای مثال Schwenninger & Meile (2004)، مخلوطی از اسید لاکتیک باکتری‌ها نظیر پروپیونی باکتریوم جنسنی[8] و لاکتوباسیلوس پاراکازئی را برای جلوگیری از فساد مخمری در پنیر و ماست بکار بردند. نتایج آن‌ها نشان داد که گونه‌های ذکر شده بدون اثر روی خصوصیات کیفی مواد غذایی، بر روی مخمرهای عامل فساد در دمای ۶ درجه سانتی‌گراد اثر بازدارندگی داشتند.

فعالیت ضد قارچی اسید لاکتیک باکتری‌ها در مطالعات پیشین به اثبات رسیده است ولی مطالعه‌ای در خصوص اسیدلاکتیک باکتری‌های جدا شده از چال علیه ساکارومایسس سرویزیه، کلیورومایسس مارکسیانوس و رودوترولا گلوتینیس انجام نشده است. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر ضد مخمری اسید لاکتیک باکتری‌های جدا شده از چال علیه مخمرهای عامل فساد مواد غذایی از جمله دوغ (ساکارومایسس سرویزیه،کلیورومایسس مارکسیانوس و رودوترولا گلوتینیس) به منظور تعیین نگهدارنده زیستی در صنعت دوغ بوده است.

مواد و روش

تهیه سویه میکروبی

سویه‌های لاکتوباسیلوس برویس و انتروکوکوس فاسیوم مورد استفاده در این پژوهش شامل جدایه‌های بدست آمده از چال به ترتیب با کدهای ۱۷ و ۸ می‌باشد که از کلکسیون میکروبی دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه گردید (Zarei., 1391).

علاوه بر این سویه‌های مخمری استفاده شده در این تحقیق (کلیورومایسس مارکسیانوس (PTCC ۵۱۹۳) ، ساکارومایسس سرویزیه(PTCC ۵۰۵۲)، رودوترولا گلوتینیس (PTCC ۵۲۵۶)) نیز از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. سویه‌های مخمر مورد نظر در محیط کشت YM براث (Yeast Malt Broth) در دمای ۳۰ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند تا فعال گردند سپس سوسپانسیون مخمر حاوی 10^7 CFU/ml بر اساس

1. Lactobacillus paracasei
2. graminearum Fusarium
3. proliferatum Fusarium
4. Aspergillus fumigatu
5. Fusarium sporotrichioides
6. Rhodotorula mucilaginosa
7. Penicillium roqueforti
8. Propionibacterium jensenii

استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند تهیه گردید. همچنین سویه‌های باکتریایی نیز در محیط کشت MRS براث (Deman- Rogosa- Sharp broth) به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت تحت شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد فعال و مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی فعالیت ضد قارچی اسید لاکتیک باکتری‌ها به روش دولایه

در این روش، سویه‌های فعال شده باکتریایی، بر روی محیط کشت جامد (MRS آگـا ر) انتقال و به صورت سطحی کشت داده شد سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط بی‌هوازی گرمخانه گذاری شدند. در نهایت با لوپ از کلنی‌های رشد یافته در محیط کشت جامد برداشته و بر روی محیط کشت MRS آگار ۲ خط به طول ۳ سانتی‌متری (با فاصله ۲ سانتی‌متری از هم) کشیده شد. پلیت‌ها برای رشد باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط بی‌هوازی، گرمخانه گذاری شدند.

بعد از رشد کلنی‌های باکتریایی بر روی خطوط ۳ سانتی‌متری، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت عصاره مالت آگار نرم (۰/۰۵ درصد عصاره مالت و ۱ درصد آگار) که حاوی 10^6 سلول مخمر در میلی‌لیتر می‌باشد، به آرامی بر روی پلیت‌های شامل باکتری‌های بالا ریخته شد و اجازه داده شد تا محیط کشت کاملا سفت شود. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط هوازی گرمخانه گذاری شدند. بعد از ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت و همچنین تا زمانی که میزان بازدارندگی به صفر نزدیک می‌شد، قطر هاله بازدارندگی از رشد خطوط ۳ سانتی‌متری اندازه‌گیری شد (Magnusson and Schnu., 2001).

تولید دوغ

تولید دوغ در این پژوهش با روش رقیق‌سازی ماست (نسبت ۵۰: ۵۰ + ۰/۷ نمک) انجام شد. جهت تولید ماست پودر شیر خشک (تهیه شده ازشرکت لبنیات پگاه گلستان) کم چرب با آب مخلوط و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استریل گردید و دمای آن تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. سپس ۳ درصد استارتر (استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریس) و سوسپانسیون لاکتوباسیلوس برویس و انتروکوکوس فاسیوم به شیر استریل اضافه و در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. میزان اسید لاکتیک باکتری‌ها و مخمرها براساس شمارش کلنی حدود 10^7 و 10^4 CFU/ml در دوغ بود. در نهایت دوغ تولیدی در بطری ۲۵۰ میلی‌لیتری استریل در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد طی ۱۵ روز نگهداری شد (Tamime *et al*., 1984).

آنالیز میکروبی

به منظور شمارش میکروبی نمونه‌های دوغ با سرم فیزیولوژی به روش سریالی رقیق‌سازی گردید و در محیط کشت سلول‌های زنده کشت داده شده و سپس شمارش شدند. برای شمارش مخمرها از محیط کشت YM آگار و برای باکتری‌های اسید لاکتیک از MRS آگار استفاده شد (Downes, and Ito., 2001).

آنالیز شیمیایی

pH بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۴۵۳ انجام شد (Iran national standard، 1387).

آنالیز آماری

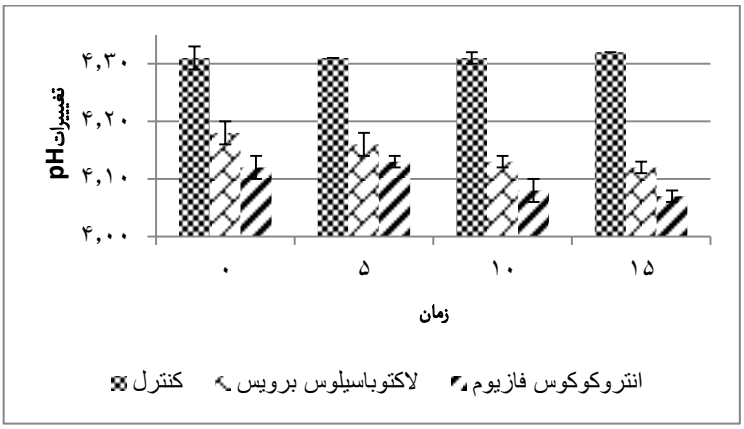
داده‌های حاصل از ارزیابی ضد میکروبی در فرمولاسیون دوغ در طرح اسپلیت پلات توسط نرم افزار SAS 9.1 تجزیه شد و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۹۵٪ انجام گرفت. رسم نمودار با نرم افزار اکسل صورت گرفت.

نتایج و بحث

تغییراتpH

نتایج اندازه‌گیری تغییرات pH نمونه‌های دوغ حاوی لاکتوباسیلوس برویس و انتروکوکوس فاسیوم در طی مدت ماندگاری در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، pH نمونه‌های دوغ حاوی انتروکوکوس فاسیوم در روز اول تولید نسبت به نمونه‌های دوغ حاوی لاکتوباسیلوس برویس و نمونه کنترل (فاقد اسید لاکتیک باکتری ایزوله شده از چال) بیشتر کاهش یافته است ولی این کاهش pH معنی‌دار نیست ، علاوه بر آن pH نمونه کنترل در طی مدت ماندگاری تغییری نداشت. در حالی که pH نمونه‌های حاوی لاکتوباسیلوس برویس و انتروکوکوس فاسیوم در طی مدت ماندگاری از ۴/۱۸ و ۴/۱۲ به ۴/۱۲ و ۴/۰۷ به ترتیب کاهش یافته است. همانطور که قبلا ذکر شد، متابولیت‌های زیادی در اثر ضد قارچی اسید لاکتیک باکتری‌ها نقش دارند که اسیدهای آلی یکی از این عوامل هستند؛ همانطور که نتایج ما نیز نشان داد میزان این اسیدها در نمونه‌های مورد آزمون ما بیشتر از نمونه کنترل بودند که یکی از دلایل فعالیت ضد قارچی آنها می‌باشد. برخلاف مطالعه حاضر، Delavenne *et al*.(2012) نشان دادند که لاکتوباسیلوس رامنوسوس[1] نسبت به استارتر ماست بر pH ماست تاثیری ندارند. بنابراین تفاوت در تغییرات pH نمونه‌ها مختلف را می‌توان به گونه‌ها و نژادهای مختلف باکتریایی نسبت داد.

1.Lactobacillus rhamnosus



شکل۱. تغییرات pH نمونه‌های دوغ حاوی لاکتوباسیلوس برویس و انتروکوکوس فاسیوم در طی مدت ماندگاری

فعالیت ضد مخمری به روش د و لایــه

نتایج حاصل از فعالیت ضد مخمری لاکتوباسیلوس برویس و انتروکوکوس فاسیوم ایزوله شده از چال در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که لاکتوباسیلوس برویس و انتروکوکوس فاسیوم دارای فاقد تاثیر ممانعت کنندگی علیه مخمر ساکارومایسس سرویزیه می‌باشند ولی این دو باکتری در برابر رودوترولا گلوتینیس تاثیر ممانعت کنندگی قوی از خود نشان دادند. همچنین لاکتوباسیلوس برویس فاقد اثر ممانعت کنندگی در برابر کلیورومایسس مارکسیانوس بود و علاوه بر این انتروکوکوس فاسیوم نیز اثر ممانعت کنندگی ضعیف علیه این مخمر از خود نشان داد. نتایج تحقیق Magnoson *et al*.(2001) نشان داد که اسید لاکتیک باکتری‌های ایزوله شده از محیط‌های مختلف فاقد فعالیت ممانعت کنندگی علیه کلیورومایسس مارکسیانوس می‌باشند (Magnusson *et al*., 2001)، که با نتایج مطالعه ما مطابقت داشت. در حالی که نتایج حاصل از بررسی اثر ضد قارچی تعدادی از لاکتوباسلوس‌های کلکسیونی ازجمله لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلنتاروم[1] و چند لاکتوباسیلوس دیگر علیه ۹ قارچ کلکسیونی نظیر آسپرژیلوس نایجر[2]، رایزوپوس اوریزا[3]، پنی سیلیوم روکفورتی، کاندیدا گلورماندی[4] و پنی سیلیوم کاممبرتی[5] به روش دولایه توسط Falguni *et al* (2010) نشان داد که از بین ۴۰ لاکتوباسیلوس مورد بررسی، لاکتوباسیلوس برویس قوی‌ترین اثر بازدارندگی را علیه قارچ‌های شاخص از خود نشان داد. علاوه برآن Voulgari *et al*.(2010) گزارش کردند که گونه لاکتوباسیلوس پارا کازئی جدا شده از پنیرهای مختلف و ۱۵ گونه لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریس جدا شده از محصولات لبنی علیه کپک پنی سیلیوم کاندیدوم[6] و ۲ مخمر دباریومایسس هانسنی[7] و ساکارومایسس سرویزیه خاصیت بازدارندگی رشد از خود نشان دادند.

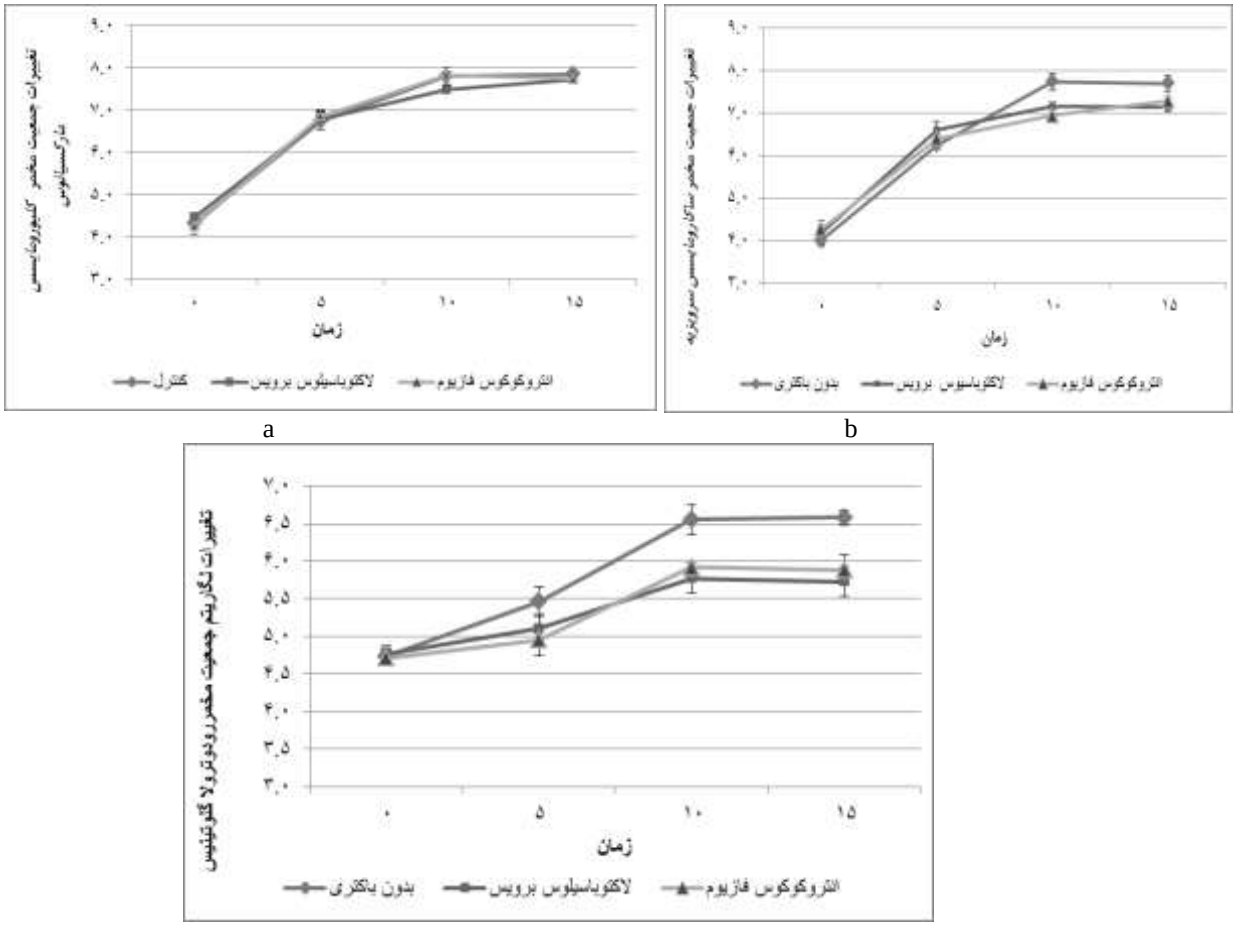
تفاوت‌های موجود در رابطه با حساسیت مخمرهای مختلف در برابر جنس‌های گوناگون اسید لاکتیک باکتری‌ها را می‌توان به نوع میزان متابولیت‌های تولیدی توسط اسید لاکتیک باکتری‌ها و میزان مقاومت مخمرها به این متابولیت‌ها نسبت داد. مواد غذایی به منظور جلوگیری از رشد مخمرها نیازمند نگهدارنده‌های کارآمد و ایمن هستند. اسید لاکتیک باکتری‌ها متابولیت‌های ضد میکروبی ویژه‌ای نظیر اسیدهای آلی (اسید لاکتیک، استیک اسید، فنیل لاکتیک اسید و پروپیونیک اسید) و ترکیباتی با وزن مولکولی پایین تولید می‌کنند که تاثیر ضد میکروبی این ترکیبات با تاثیر سینرژیستی، افزایش می‌یابد (Okkers *et al*., 1999;Niko paavola *et al*., 1999; Vermeulen *et al*., 2006; Valerio *et al*., 2004; Stiles., 1996). در مطالعات گوناگون فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های انتروکوکوس و لاکتوباسیلوس برویس به ترتیب به انتروسین A و ترکیبات پروتئین مانند طبیعی (پروتئینوسئوس) نسبت داده شده است (Mirhosseini., 1391;Falguni *et al*., 2010).

فعالیت ضد مخمری اسید لاکتیک باکتری‌ها در دوغ

فعالیت ضد مخمری لاکتوباسیلوس برویس و انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از چال در دوغ طی مدت نگهداری ۱۵ روز در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود لاکتوباسیلوس برویس و انتروکوکوس فاسیوم از لحاظ تاثیر بر مخمرهای مورد آزمون با هم دیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

1 .Lactobacillus plantarum
2. niger Aspergillus
3 .Rhizopus oryzae
4.Candida guillermondii
5.camemberti Penicillium

6 .candidum Penicillium
7 .hansenii Debaryomyces



شکل ۲. تاثیر ضد مخمریلاکتوباسیلوس برویسوانتروکوکوس فاسیوم ایزوله شده از چال بر کلیورومایسس مارکسیانوس،ساکارومایسس سرویزیه و رودوترولا گلوتینیس در دوغ طی مدت نگهداری(به ترتیب شکل‌های a، b و c)

جدول ۱. تاثیر ضد مخمری لاکتوباسیلوس برویس و انتروکوکوس فاسیوم ایزوله شده از چال

	ساکارومایسس سرویزیه	کلیورومایسس مارکسیانوس	رودوترولا گلوتینیس
لاکتوباسیلوس برویس	-۱	-	+++
انتروکوکوس فاسیوم	-	+	+++

هر دو باکتری بر روی کلیورومایسس مارکسیانوس فاقد تاثیر ممانعت کنندگی هستند و با نمونه های دوغ حاوی مخمر فاقد باکتری از لحاظ جمعیت مخمری تفاوتی ندارند. علاوه بر آن نمونه‌های دوغ حاوی اسید لاکتیک باکتری‌های مورد مطالعه در این آزمون نیز از لحاظ تاثیر بر روی مخمر ساکارومایسس سرویزیه با نمونه های دوغ فاقد باکتری تفاوت چندانی ندارند. در حالی که این دو باکتری توانستند میزان مخمر رودوترولا گلوتینیس در طی ۱۵ روز ماندگاری حدود یک سیکل لگاریتمی نسبت به نمونه‌های فاقد باکتری کاهش دهند. تفاوتی که در حساسیت بین مخمرهای مورد آزمون مشاهده می‌شود ممکن است به ظرفیت‌شان در تغییر متابولیسم سلول در پاسخ به شرایط اسیدی محیط بستگی داشته باشد (Yang *et al*., 1993).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از بررسی تاثیر ضد مخمری لاکتوباسیلوس برویس و انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از چال نشان داد که این باکتری‌ها علیه مخمر رودوترولا گلوتینیس بازدارندگی قوی‌ای دارند. ضمن این که این دو باکتری توانستند در دوغ نیز میزان مخمر رودوترولا گلوتینیس را در طی ۱۵ روز ماندگاری حدود یک سیکل لگاریتمی نسبت به نمونه‌های فاقد باکتری‌های مورد آزمون کاهش دهند. بنابراین پیشنهاد می‌گردد که از اسید لاکتیک باکتری‌های جدا شده از چال به منظور جلوگیری از فساد قارچی مواد غذایی مستعد فساد با مخمر رودوترولا گلوتینیس به ویژه در دوغ، بعنوان نگهدارنده زیستی و ایمن استفاده گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب سپاس خود را از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران به خاطر تامین بودجه این تحقیق اعلام می دارند.

REFERENCES

Anon-b. Iran national standard for plain Doogh; No. 2453. Available on www.isiri.org. (In Farsi)

Davidson, P. (2001). Food microbiology–fundamentals and frontiers. Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds"(Eds Doyle, MP). 593-627.

Delavenne, E., Ismail, R., Pawtowski, A., Mounier, J., & Barbier, B. (2012). Assessment of lactobacilli strains as yoghurt bioprotective cultures. *Food Co*., 30, 206-213.

Downes, F. P. & Ito, K. (eds.). (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American, Public Health Association (APHA). Washington D.C.

Falguni, P., Shilpa, V., & Mann, B. (2010). Production of proteinaceous antifungal substances from Lactobacillus. brevis NCDC 02. *I J Dai Tech*., 63, 70-76.

Hassan, Y. I., & Bullerman, L. B. (2008). Antifungal activity of Lactobacillus paracasei ssp. tolerans isolated from a sourdough bread culture. *I j food microbio*., 121(1), 112-115.

Khorasanchi, N., Peighambardoust, S H., Golshan Tafti, A., Hejazi ,M A., and Rafa, S A.(1390) . Evaluating the ability of liquid sourdough containing L. plantarum and L. reuteri starters in inhibition of bread mold spoilage. *J food Reas*. 21(3), 391- 400. (In Farsi)

Ledenbach, L.H., Marshall, R.T. (2010). Microbiological spoilage of dairy products. Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages: Springer. p. 41-67.

Magnusson, J., & Schnu¨rer, J. (2001). Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis strain Si3 produces abroad-spectrum proteinaceous antifungal compound.*Appl. Environ. Microbiol*. 67, 1–5.

Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., & Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbio Let., 219(1), 129-135.

Mayoral, M .B., Martin, R., Sanz, A, Hernandez, P. E., Gonzalez, I. & Garcia, T. (2005). Detection of Kluyveromyces. marxianus and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique. *I J of Food Microbio*. 105, 27–34.

Mirhosseini, M.(1391). Identification of bacteriocin producing Enterococcus in dairy products by PCR. Iran j bio. 25(3) , 351- 357. (In Farsi)

Niku-paavola, M.-L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T. and Haikara, A. (1999) New types of antimicrobial compounds produced by Lactobacillus plantarum. *J. Appl. Microbiol*., 86, 29-35.

Okkers, D.J., Dicks, L.M.T., Silvester, M., Joubert, J.J. & Odendaal, H.J. (1999) Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from Lactobacillus pentosus with a fungistatic e!ect on Candida albicans. *J. Appl. Microbiol*., 87, 726-734.

Pawlowska, A. M., Zannini, E., Coffey A, 2012 Arendt EK. 5" Green Preservatives": Combating fungi in the food and feed industry by applying antifungal lactic acid bacteria. Adv in food and nutr res. 66, 217.

Pitt, J. I., Hocking, A. D. (2009). Primary keys and miscellaneous fungi. In: Pitt, J.I, Hocking, A. D eds., Fungi and food spoilage. New York NY., 122-124.

Schnürer, J., Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. Tre in Food Scie & Techno. 16(1):70-8.

Schwenninger, S. M., & Meile, L. (2004). A mixed culture of Propionibacterium jensenii and Lactobacillus paracasei subsp. paracasei inhibits food spoilage yeasts. System and appl microbio., 27(2), 229-237.

Sperber, W. H, Doyle, M. P. (2009). Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages: Springer.

Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek., 70, 331–345.

Tamime, A.Y., M. Kalab & G. Davies. (1984). Microstructure of set-style yoghurt manufacture from cow milk fortified by various methods. *Food Micros.*, 3, 83-92.

Valerio, F., Lavermicocca, P., Pascale, M., & Visconti, A. (2004). Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: An approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiol Let*. 233,289–295.

Vermeulen, N., Gonzle, M. G., & Vogel, R. F. (2006). Influence of peptide supply and co-substrates on phenylalanine metabolism of Lactobacillus sanfranciscensis DSM20451T and Lactobacillus plantarum TMW1.468. *J Agri and Food Che*. 54, 3832–3839.

Viljoen, B. C. (2003). Temperature abuse initiating yeasts growth in yoghurt. *Food Re Inter*. 36: 193-197.

Voulgari, K., Hatzikamari, M., Delepoglou,. A, Georgakopoulos, P., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N. 2010. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. *Food Co*. 21(2),136-42.

Yang, E., Chang, H. (2010). Purification of a new antifungal compound produced by Lactobacillus plantarum AF1 isolated from kimchi. *Inter j of food microbio*. 139(1):56-63.

Yang, Y., Bastos, M. & 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.

Zarei,b.(1391). Isolation and identification of microflora fermented dough well and use them in production. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of M.Sc. in Food science and microbiology, Gorgan University ofAgricultural Sciences and Natural Resources. (In Farsi).