ارزیابی خواص ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده از خمیرترش آرد کامل جو

فرزانه کیا دلیری[۱]، علیرضا صادقی[۱*]، مرتضی خمیری[۱]، مهدی کاشانی نژاد[۱]، مهران اعلمی[۱]

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۶/۲۱)

چکیده

در این پژوهش، پس از شناسایی مولکولی آغازگر غالب *لاکتوباسیلوس* موجود در خمیرترش آرد کامل جو، خصوصیات ضد میکروبی جدایه مذکور و پالیده‌های خام و خنثی شده حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون آن در برابر برخی از شاخص‌های باکتریایی و قارچی غذازاد مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز آماری نتایج این پژوهش نیز با استفاده از طرح پایه کاملاً تصادفی به روش فاکتوریل صورت پذیرفت. بر اساس نتایج توالی‌یابی محصولات PCR، *لاکتوباسیلوس برویس* به عنوان جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش آرد جو شناسایی شد. برای ارزیابی خواص ضد باکتریایی این جدایه از روش‌های انتشار در دیسک و میکرودایلوشن و همچنین به منظور مطالعه خاصیت ضد قارچی آن از روش‌های کشت دو لایه و لکه‌گذاری سوسپانسیون اسپور قارچ استفاده گردید. بر اساس نتایج آزمون دیسک، بیشترین تاثیر ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس برویس* در برابر *باسیلوس سوبتیلیس* و کمترین مقدار آن در برابر *اشرشیا کلی* مشاهده شد. همچنین بیشترین درصد کاهش جمعیت شاخص‌های باکتریایی مورد مطالعه در روش ریز رقت، مربوط به *باسیلوس سوبتیلیس* با ۷۹/۵۵ درصد در معرض پالیده خام فاز لگاریتمی *لاکتوباسیلوس برویس* بود. علاوه بر این، خاصیت ضد قارچی *لاکتوباسیلوس برویس* بر علیه *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* در روش کشت دو لایه مورد تایید قرار گرفت که این قابلیت در برابر دو شاخص مذکور، اختلاف معنی‌داری ($\alpha<0/05$) نداشت. پالیده خام حاصل از فاز لگاریتمی این جدایه لاکتیکی نیز نسبت به سایر پالیده‌ها به شکل معنی‌داری ($\alpha<0/05$) از تاثیر بازدارندگی بیشتری بر روی *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* در روش لکه‌گذاری سوسپانسیون اسپور قارچ برخوردار بود.

کلید واژگان: *لاکتوباسیلوس برویس*، خمیرترش آرد کامل جو، فعالیت ضد میکروبی، پالیده کشت

* مسئول مکاتبات: sadeghi.gau@gmail.com

۱- مقدمه

تخمیر خمیرترش یکی از فرایندهای اصلی تخمیری در فرآوری نان محسوب می‌شود که استفاده از آن می‌تواند علاوه بر ارتقای کیفیت، سبب ایجاد طعم و آرومای مطلوب‌تر، ممانعت از فساد قارچی و باکتریایی و همچنین تعویق بیاتی نان گردد [۱و۲]. اصطلاحاً به مخلوط آب و آرد تخمیر شده غلات توسط باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها، خمیرترش اطلاق می‌شود که تقابل بین مخمرها و باکتری‌های اسید لاکتیک بر فعالیت متابولیکی آن تاثیرگذار است [۳و٤]. مهم‌ترین باکتری-های جدا شده از خمیرترش به جنس *لاکتوباسیلوس* تعلق دارند [۵]. *لاکتوباسیلوس‌ها* باکتری‌های اسید لاکتیک گرم مثبت، فاقد اسپور و کاتالاز منفی هستند که محصول نهایی تخمیر توسط آنها اسید لاکتیک می‌باشد. این باکتری‌ها با تولید پراکسید هیدروژن، دی‌استیل، استالدئید، پپتیدهای ضد قارچی و باکتریوسین‌ها می‌توانند دارای اثرات بازدارندگی وسیعی بر روی بسیاری از میکروارگانیسم‌ها (ریز اندامگان) باشند [٦و۷]. با گسترش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و مضرات نگهدارنده-های شیمیایی، استفاده از خاصیت نگهدارندگی زیستی باکتری-های اسید لاکتیک همواره به عنوان یک روش جایگزین مطرح بوده است [۸]. تاکنون مطالعات فراوانی در خصوص شناسایی مولکولی و ارزیابی خاصیت ضد میکروبی جدایه‌های لاکتیکی خمیرترش صورت گرفته است. برای مثال، کرستی و همکاران با استفاده از PCR و آنالیز توالی ١٦s rDNA، گونه جدیدی را از بین باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از خمیرترش ایتالیایی، به نام *لاکتوباسیلوس روسی* (*Lactobacillus rosisi*) شناسایی کردند [۹]. سیمسک و همکاران، باکتری-های اسید لاکتیک نظیر *لاکتوباسیلوس برویس* (*Lactobacillus brevis*)، *لاکتوباسیلوس ویریدانس* (*Lactobacillus viridances*) را به عنوان گونه‌هایی که دارای بیشترین قابلیت بروز خاصیت ضد میکروبی بودند از خمیرترش آرد گندم جداسازی نمودند [۱۰]. تودورو و همکاران، ترکیبات ضد باکتریایی تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) را در خمیرترش، شناسایی و خصوصیات آن را تعیین کرده‌اند [۱۱]. منتس و همکاران نیز نشان دادند که جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس آلیمنتاریوس* (*Lactobacillus alimentarius*)، فعالیت *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) و *باسیلوس لیچنیفورمیس* (*Bacillus licheniformis*) را به تعویق می‌اندازند [۱۲]. امروزه تمایل به استفاده از خمیرترش به عنوان یک نگهدارنده زیستی در حال افزایش است زیرا فلور میکروبی آن نه تنها از فعالیت میکروارگانیسم‌های مولّد فساد جلوگیری می‌کنند، بلکه قابلیت بهبود ارزش تغذیه‌ای و ایجاد خواص سلامتی‌بخش را نیز دارند [۵و۸]. هدف از این پژوهش، جداسازی، شناسایی مولکولی و ارزیابی خواص ضد میکروبی یکی از جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو و پالیده‌های حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون آن در برابر برخی از شاخص-های باکتریایی و قارچی مواد غذایی بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

ابتدا آرد کامل جو رقم گرگان ٤ تهیه و ویژگی‌های آن شامل پروتئین ١١/٦ درصد، کربوهیدارت ٦١/٧ درصد و خاکستر ۱/۹ درصد بر اساس روش‌های مدوّن AACC (۲۰۱۰)، تعیین گردید [۱۳]. شاخص‌های باکتریایی مورد استفاده شامل *اشرشیا کلی* (*Escherichia coli* PTCC ۱۳۹۹)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus* PTCC ۱۱۱۲)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes* PTCC ۱۲۹۸) و *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis* PTCC ۱۷۲۰) و همچنین قارچ‌های مورد استفاده شامل *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger* PTCC ۵۰۱۲) و *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus* PTCC ۵۰۰٦) از کلکسیون میکروبی ایران تهیه شدند. محیط‌های کشت و مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش نیز از شرکت Merck آلمان خریداری گردیدند.

۲-۲- آماده‌سازی خمیرترش

پس از تهیه پیش تیمارهایی با نسبت‌های مختلف آرد به آب (۲۰ تا ۵۰ درصد)، نهایتاً نسبت ۳۰ درصد آرد به آب بر اساس روند تغییرات اسیدیته قابل تیتر برای تهیه خمیرترش آرد کامل جو انتخاب شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت تخمیر گردید [٦]. تخمیر خمیرترش در روزهای بعد با

فرآیند مایه‌گیری[1] (افزودن ۲۰ درصد از خمیرترش قبلی به خمیرترش روز بعد) و ارزیابی روزانه مقادیر pH و اسیدیته قابل تیتر آن تداوم یافت [۱].

۲-۳- ارزیابی pH و اسیدیته قابل تیتر خمیرترش

برای تعیین مقدار اسیدیته قابل تیتر خمیرترش (برحسب اسید لاکتیک)، ۱۰ گرم از هر نمونه خمیرترش آرد جو با ۹۰ میلی-لیتر آب مقطر، مخلوط شد و محلول مذکور با سود ۰/۱ نرمال تا رسیدن به pH نهایی ۸/۵ تیتر گردید. اسیدیته قابل تیتر بر حسب میلی‌لیتر سود مصرفی بیان شد. میزان pH خمیرترش نیز در هر مرحله پس از تخمیر با pH متر (مدل 766 Calimatic،Knick، آلمان) تعیین گردید [۸].

۲-٤- جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک غالب

ابتدا از نمونه خمیرترش، رقت‌های متوالی تهیه گردید و به صورت سطحی بر روی پلیت حاوی MRS Agar کشت داده شد. پس از خالص‌سازی پرگنه‌های به‌دست آمده، از آن‌ها اسلاید میکروبی تهیه گردید و با رنگ‌آمیزی گرم و آزمون کاتالاز مورد بررسی قرار گرفت [۱٤و ۱۵].

۲-۵- استخراج DNA

پس از انجام آزمون‌های رنگ آمیزی گرم و کاتالاز، از تک پرگنه کشت خطی جدایه‌های لاکتیکی، DNA توسط کیت (Bioneer K-3032، کره جنوبی) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. لازم به توضیح است که برای اطمینان از صحت روش مذکور نیز از تمامی پرگنه‌های حاصل از بیشترین رقت به دست آمده از فرایند مایه‌گیری انتهایی، DNA استخراج شد و با پرایمر
مورد نظر توسط PCR، تکثیر و نهایتا محصولات PCR نیز توالی‌یابی گردید تا بدین طریق، دستیابی به تک پرگنه خالص جدایه لاکتیکی تایید شود.

۲-٦- واکنش PCR

واکنش PCR برای شناسایی جدایه مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی F: GAACGCGAAGAACCTTAC و R: GCGTGTGTACAAGACCC (5'-3') اجرا شد. توالی هدف تکثیر نیز بخشی از ناحیه متغیر v6-v8 جایگاه 16S rDNA به طول ۵۰۰ جفت باز بود. مقادیر واکنش‌گر-های PCR (Robust، فرانسه) و چرخه‌های دمایی تکثیر (ترموسایکلر Corbett، استرالیا) نیز مطابق روش فرچیچی و همکاران (۲۰۰۷) اجرا گردید [۱٤]. برای تایید اولیه تکثیر، محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد رنگ سایبر سیف[2] (Invitrogen، آمریکا) الکتروفورز گردیدند. در نهایت محصولات PCR جهت تعیین توالی به شرکت MWG آلمان فرستاده شد و پس از ارزیابی میزان هم‌ردیفی توالی‌های به دست آمده با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI جدایه لاکتیکی شناسایی گردید [۱٦].

۲-۷- تعیین فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه لاکتیکی

به منظور مقایسه تاثیر خاصیت ضد میکروبی پالیده کشت جدایه لاکتیکی در فازهای رشد لگاریتمی و سکون، منحنی رشد آن با تعیین مقادیر جذب در زمان‌های معین و در طول موج ٦۰۰ نانومتر (اسپکتروفتومتر T80 Double BEAM UV- Visible، PGI، انگلستان) ترسیم گردید [۱۷].

۲-۸- بررسی خاصیت ضد باکتریایی

برای ارزیابی خواص ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی از دو روش انتشار در دیسک و ریز رقت استفاده گردید.

۲-۸-۱- روش دیسک

در این روش ابتدا جدایه لاکتیکی و باکتری‌های شاخص (*اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *باسیلوس سوبتیلیس*) در محیط کشت اختصاصی (به ترتیب[3]VRBA، [4]BPA، [5]BAB و [6]BcSA) فعال‌سازی شدند. سپس ٤۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری‌های شاخص (1×10^8 cfu/ml) بر روی پلیت حاوی Nutrient Agar به صورت سطحی کشت داده شد. در ادامه، دیسک‌های کاغذی استریل (پادتن طب، ایران) به قطر ٦ میلی‌متر با فاصله معین از یکدیگر و لبه پلیت بر روی سطح محیط حاوی کشت سطحی باکتری‌های شاخص قرار داده شد. به دیسک‌های

1. Back sloping

2. SYBR safe
3. وایولت رد بایل آگار
4. برد پارکر آگار
5. بلاد آگار بیس
6. *باسیلوس سرئوس* سلکتیو آگار

کاغذی ٤٠ میکرولیتر باکتری زنده و فعال با 1×10^{8} cfu/ml افزوده گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ٤٨ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سرانجام قطر هاله عدم رشد هر یک از باکتری‌های شاخص با نرم افزارImageJ اندازه‌گیری گردید [١٨].

٢-٨-٢- تهیه پالیده کشت جدایه لاکتیکی

ابتدا جدایه لاکتیکی در محیط MRS Broth، در شرایط بی-هوازی و دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد تا ایجاد کدورتی معادل ٠/٥ مک فارلند (1×10^{8} cfu/ml) گرمخانه‌گذاری شد. سپس برای تهیه پالیده کشت جدایه لاکتیکی حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون، محیط کشت حاوی باکتری مذکور به مدت ٥ دقیقه در دمای ٥ درجه سانتی‌گراد با دور g ١٤٠٠٠ سانتریفوژ (hanil, combi 514R ، کره جنوبی) شد. مایع رویی به دست آمده از سانتریفوژ برای اطمینان از عدم حضور سلول باکتریایی از فیلتر سرنگی ٠/٢٢ میکرومتر (JET BIOFIL، چین) عبور داده شد (پالیده خام). در ادامه، پالیده کشت جدایه لاکتیکی با سود ١ نرمال تا pH=٧ خنثی گردید (پالیده خنثی) [١٩].

٢-٨-٣- روش ریز رقت

برای این منظور جمعیت هر یک از باکتری‌های شاخص مورد استفاده با گرمخانه‌گذاری در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد به 1×10^{8} cfu/ml رسانیده شد. سپس اثر پالیده خام و خنثی شده جدایه لاکتیکی حاصل از دو فاز رشد لگاریتمی و سکون، بر روی شاخص‌های مورد نظر بررسی گردید. در این آزمون، نمونه کنترل مثبت شامل مخلوط پالیده خام و باکتری شاخص و نمونه کنترل منفی شامل مخلوط محیط کشت و شاخص باکتریایی اتوکلاو شده بودند. همچنین در چاهک مربوط به پالیده‌های خام و خنثی شده مقدار ١٨٥ میکرولیتر از هر پالیده و ١٥ میکرولیتر از شاخص باکتریایی مورد نظر اضافه گردید. این میکروپلیت‌ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و سپس توسط دستگاه خوانش الایزا (sdco، روسیه) در طول موج ٦٢٠ نانومتر خوانش صورت گرفت [٢٠].

٢-٩- بررسی خاصیت ضد قارچی

برای این منظور از روش‌های لکه گذاری اسپور و کشت دو لایه در برابر قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* استفاده شد.

٢-٩-١- روش لکه‌گذاری اسپور

ابتدا در پلیت‌های ٦ سانتی‌متری، محیط کشت YGC Agar به نسبت ٩ به ١ با پالیده کشت جدایه لاکتیکی (پالیده خام و یا خنثی‌شده) مخلوط گردید. برای تهیه اسپور از کشت ٧ روزه قارچ‌های شاخص در دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت YGC، ابتدا اسپورها با آب مقطر شسته و سپس جمع-آوری گردیدند. در ادامه، اسپور قارچ‌های شاخص توسط لام هموسیتومتر شمارش شده و به تعداد نهایی 10^{5} اسپور به ازای هر میلی‌لیتر رقیق گردیدند. در مرحله بعد ٣ میکرولیتر از اسپور قارچ در مرکز پلیت قرار داده شد و تمامی نمونه‌ها در دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. قطر کلنی قارچ رشد کرده در هر ٢٤ ساعت تا زمانی که نمونه فاقد پالیده کشت جدایه لاکتیکی تمام سطح پلیت را پوشاند با نرم افزار ImageJ اندازه‌گیری گردید [٢١].

٢-٩-٢- روش کشت دو لایه

برای این منظور، با سوآب استریل از کشت جدایه لاکتیکی فعال به صورت دو خط موازی به طول ٣ سانتی‌متر و فاصله متناسب از یکدیگر در مرکز پلیت‌های حاوی MRS Agar کشت داده شد و سپس برای ٧٢ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. شمارش اسپورها همانند مرحله قبل با استفاده از لام هموسیتومتر انجام شد و اسپورها تا تعداد 10^{5} اسپور در هر میلی‌لیتر رقیق گردیدند. در مرحله بعد ١ میلی‌لیتر از اسپور قارچ با ٩ میلی‌لیتر از محیط کشت YGC Agar مخطوط گردید و بر روی خطوط کشت داده شده جدایه لاکتیکی ریخته شد (کشت دو لایه). پس از انعقاد لایه دوم، پلیت‌ها در دمای ٣٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند. قطر هاله عدم رشد قارچ‌های شاخص نیز در اطراف خطوط کشت داده شده جدایه لاکتیکی در هر ٢٤ ساعت اندازه‌گیری شد [٢٢].

٣- آنالیز آماری نتایج

داده‌های به دست آمده با استفاده از روش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و با ٣ تکرار مورد آنالیز قرار گرفت. نرم‌افزارهای آماری مورد استفاده نیز Microsoft Office Excel 2013 و SAS 9.1.3 بودند. همچنین مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ٥ درصد انجام گردید.

٤- نتایج و بحث

٤-١- جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس غالب خمیرترش آرد کامل جو

پس از سه روز از تکرار فرآیند مایه‌گیری خمیرترش با ثبات نسبی pH و اسیدیته قابل تیتر آن، *لاکتوباسیلوس* غالب جداسازی شد. نتایج الکتروفورز محصولات PCR (شکل ۱)، حاکی از تکثیر توالی هدف ۵۰۰ جفت بازی بود. پس از ارزیابی میزان هم‌ردیفی توالی‌های به‌دست آمده با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI، جدایه لاکتیکی به عنوان *لاکتوباسیلوس برویس* (*Lactobacillus brevis*)، شناسایی گردید. بر اساس گزارش‌های موجود، گوبتی و همکاران، ٤٩٪ *لاکتوباسیلوس برویس* و ٢١٪ *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و درصد کمی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (*Lactobacillus fermentum*) را از یک نمونه خمیرترش آرد گندم جداسازی کردند [٢٣]. وود و هولزاپفل نیز گزارش کردند که *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* باکتری‌های غالب در خمیرترش هستند [٢٤]. تفاوت باکتری‌های غالب در این دو مطالعه می‌تواند ناشی از تفاوت در مواد خام مورد استفاده به عنوان سوبسترای تخمیر باشد.

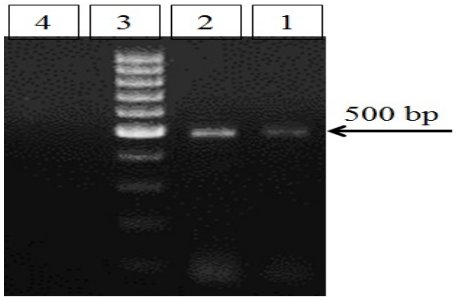

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained under optimized conditions for detection of dominant LAB isolate (500 bp). Extracted DNA from single and pure colonies of dominant LAB isolate (lane 1), extracted DNA from cultured cells of *Lactobacillus* sp. in MRS broth as positive control (lane 2), 100 bp DNA marker (lane 3) and non DNA as negative control (lane 4).

٤-٢- خاصیت ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس برویس*

٤-٢-١- خاصیت ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس برویس* در حالت فعال

بر اساس نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده از خمیرترش آرد کامل جو، علیه ٤ باکتری شاخص غذازاد به روش انتشار در دیسک، بیشترین اثر این جدایه بر علیه *باسیلوس سوبتیلیس* با قطر هاله عدم رشد ١٧/١١ میلی‌متر و کم‌ترین اثر آنتاگونیستی آن نیز در برابر *اشرشیا کلی* با قطر هاله عدم رشد ١١/٥٥ میلی‌متر مشاهده شد. قطر هاله عدم رشد *اشرشیا کلی* و *لیستریا مونوسیتوژنز* در مقایسه با *استافیلوکوکوس اورئوس* تفاوت معنی‌داری نداشت ($\alpha>0/05$) اما در مقایسه با *باسیلوس سوبتیلیس* به شکل معنی‌داری متفاوت بود ($\alpha<0/05$). در مطالعه اوگانبانو و همکاران (٢٠٠٣) فعالیت ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس برویس* در برابر چند شاخص باکتریایی بررسی شد که بیشترین اثر مهارکنندگی آن‌ها در برابر *باسیلوس سوبتیلیس* با قطر هاله عدم رشد ١٠-٨ میلی‌متر و کمترین مقدار نیز در برابر *اشرشیا کلی* با ٧-٦ میلی‌متر گزارش گردید [٢٥]. بر اساس گزارش کیائی و همکاران (٢٠٠٦)، *لاکتوباسیلوس برویس* در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*)، *اشرشیا کلی* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* (*Yersinia enterocolitica*) دارای اثر مهارکنندگی بود [٢٦]. مانینی و همکاران (٢٠١٦) نیز هیچگونه مهارکنندگی برای *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده از سبوس گندم در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* گزارش نکردند [٢٧]. کاتینا و همکاران (٢٠٠٢) دریافتند که رشد گونه های *باسیلوس* در خمیرترش حاوی *لاکتوباسیلوس برویس* تا کمتر از ١٠ cfu/g کاهش می‌یابد [٨] که این بازدارندگی احتمالاً به واسطه تولید اسید استیک به عنوان ترکیب بازدارنده رشد گونه‌های *باسیلوس* می‌باشد [٢٨و٢٩]. احتمالاً باکتریوسین‌ها و ترکیبات با وزن مولکولی پایین نیز جزء متابولیت‌های اصلی با خاصیت ضد باکتریایی موجود در خمیرترش هستند که در برابر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی موثر-ند [٣٠]. از سایر ساز و کارهای ضد باکتریایی متعددی که در باکتری‌های اسید لاکتیک گزارش شده است می‌توان به pH پایین، اثر متقابل بین اسیدهای آلی با ترکیبات دارای وزن مولکولی پایین و تولید پراکسید هیدروژن اشاره کرد [٣١].

٤-٢-٢- خاصیت ضد باکتریایی پالیده کشت *لاکتوباسیلوس برویس* در فازهای رشد لگاریتمی و سکون

با توجه به نتایج حاصل از تعیین فازهای رشد لگاریتمی و سکون *لاکتوباسیلوس برویس* مشخص شد که جدایه مذکور پس از طی ۱۰ ساعت از گرمخانه‌گذاری به انتهای فاز رشد لگاریتمی خود رسید. لذا برای ارزیابی خواص ضد باکتریایی پالیده‌های کشت حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه مذکور، به ترتیب در بازه‌های زمانی ۸ و ۱۲ ساعت از گرمخانه‌گذاری نمونه‌برداری شد. نتایج بررسی تاثیر پالیده‌های *لاکتوباسیلوس برویس* بر علیه شاخص‌های باکتریایی مورد مطالعه بر اساس روش ریز رقت در جدول ۱ ارائه شده است.

Table 1 Effects of *L. brevis* isolate CCF (cell-free culture filtrate) on population reduction of indicator foodborne bacteria (%). Columns (small letters) and rows (large letters) with different letters are significantly different ($\alpha<0.05$). Abbreviated titles for mentioned CCF are including CCF-L (logarithmic phase, natural pH), CCF-LN (logarithmic phase, neutralized pH), CCF-S (stationary phase, natural pH) and CCF-SN (stationary phase, neutralized pH).

	Escherichia coli	*Listeria monocytogenes*	*Bacillus subtilis*	*Staphylococcus aureus*
CCF-L	61.19±0.53 a, B	75.92±0.99 a, A	79.55±0.01 a, A	58.40±0.01 a, B
CCF-LN	30.23±011 b, C	43.54±1.10 b, B	50.6±0.61 b, A	23.86±0.58 b, D
CCF-S	34.76±0.01 b, B	46.67±1.00 ab, A	46.14±0.61 b, AB	38.90±0.51 b, B
CCF-SN	9.35±0.02 c, C	23.77±1.10 c, A	18.05±0.06 c, B	9.40±0.38 c, D

بر این اساس، رشد *باسیلوس سوبتیلیس* در حضور پالیده خام و خنثی‌شده *لاکتوباسیلوس برویس* در هر دو فاز رشد لگاریتمی و سکون در مقایسه با سایر شاخص‌ها بیشترین مقدار کاهش (α<۰/۰۵) را نشان داد. کمترین کاهش رشد شاخص‌ها نیز مربوط به پالیده خنثی شده فاز سکون *لاکتوباسیلوس برویس* در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* بود. در تمامی نمونه‌ها اثر بازدارندگی وابسته به pH بود زیرا درصد کاهش جمعیت شاخص‌های باکتریایی در پالیده خام و خنثی‌شده حاصل از دو فاز رشد به شکل معنی‌داری تفاوت داشت (α<۰/۰۵). علاوه بر این، تاثیر بازدارنده پالیده‌های خنثی شده حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون بر روی هر چهار شاخص باکتریایی به شکل معنی‌داری متفاوت بود (α<۰/۰۵) اما تاثیر بازدارنده پالیده خام لگاریتمی بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* با *لیستریا مونوسیتوژنز* و همچنین *اشرشیا کلی* با *استافیلوکوکوس اورئوس* اختلاف معنی‌داری نداشت (α>۰/۰۵).

توبا و همکاران (۱۹۹۱) با ارزیابی اثر ضد میکروبی پالیده خام کشت *لاکتوباسیلوس‌های* مختلف در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* دریافتند که میزان رشد شاخص‌های میکروبی کاهش یافت [۳۲]. بر اساس گزارش اوگانبانو و همکاران (۲۰۰۳) نیز نه تنها پالیده کشت *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده از خمیرترش دارای اثر مهارکنندگی در برابر شاخص‌های باکتریایی بود که حتی توانست این تاثیر را به مدت ۶۰ روز نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد کاملاً حفظ کند [۲۵]. شاه و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش دادند که خنثی‌سازی پالیده کشت به وسیله سود، اثر بازدارندگی باکتری‌های اسید لاکتیک را تا حدودی کاهش می‌دهد که می‌توان فعالیت ضد میکروبی این پالیده کشت را به مشتق‌های اسیدی تولید شده و باکتریوسین‌هایی که در pH خنثی فعال نیستند نسبت داد. تولید اسید لاکتیک و اسید استیک، مهم‌ترین عامل ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک محسوب می‌شود. حضور اسید می‌تواند سبب کاهش pH محیط و متعاقباً کاهش رشد شاخص‌های باکتریایی گردد [۳۳].

٤-۳- ارزیابی اثر ضد قارچی *لاکتوباسیلوس برویس*

٤-۳-۱- اثر ضد قارچی باکتری فعال *لاکتوباسیلوس برویس*

نتایج این پژوهش نشان داد که *لاکتوباسیلوس برویس* در مقابل قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس*، سطح متفاوتی از ممانعت‌کنندگی را بروز می‌دهد که البته این اثر دارای تفاوت معنی‌داری نبود (α>۰/۰۵). بر این اساس، قابلیت ممانعت کنندگی جدایه لاکتیکی مذکور پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری منجر به ایجاد قطر هاله عدم رشد

۴/۷۵±۰/۹۵ برای *آسپرژیلوس نایجر* و قطر هاله عدم رشد ۴/۵۹±۱/۷۳ برای *آسپرژیلوس فلاووس* شد. مانینی و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده از خمیرترش سبوس گندم، به نحو موثری دارای قابلیت مهارکنندگی رشد *آسپرژیلوس نایجر* بود [۲۷]. خاصیت بازدارندگی این باکتری بر رشد قارچ‌های مورد مطالعه را می‌توان به تاثیر متابولیت‌های تولیدی آن بر روی جوانه‌زنی و رشد قارچ در مقایسه با نمونه کنترل نسبت داد [۳۴]. کودا و همکاران (۲۰۱۱) نیز ۹ پپتید ضد قارچی جدید از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از خمیرترش، خالص‌سازی و شناسایی نمودند. محققین مذکور در یکی از این پپتیدها، ساختار مارپیچ با حداقل ۶ گروه آبگریز سطحی را تشخیص دادند که می‌توان فعالیت ضد قارچی این جدایه را به واکنش ترکیب مذکور با پوشش سطحی قارچ مرتبط دانست. علاوه بر این، در مطالعه مذکور پپتیدهای دیگری نیز شناسایی شدند که دارای اثر هم‌افزایی بر روی خاصیت ضد قارچی جدایه لاکتیکی بودند به نحوی که استفاده توام از آن‌ها اثر ضد قارچی را ۵ برابر افزایش داد [۳۵]. عوامل زیادی بر میزان اثرگذاری ترکیبات ضد قارچی تولیدی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک موثر هستند که از آن جمله می‌توان به زمان گرمخانه‌گذاری، pH و ترکیبات محیط اشاره کرد [۳۱].

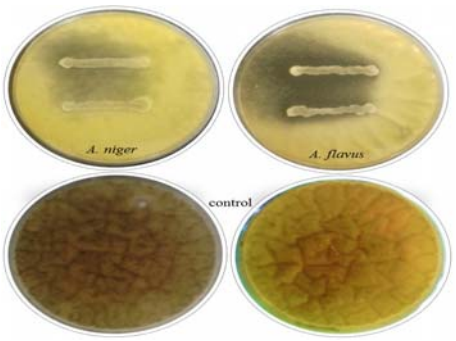

Fig 2 Activity of *L. brevis* isolate in overlay assay, against indicator fungi in comparison to control samples.

۴-۳-۲- اثر ضد قارچی پالیده *لاکتوباسیلوس برویس*

روند تغییر قطر کلنی قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* تحت تاثیر پالیده‌های کشت *لاکتوباسیوس برویس* به ترتیب در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است.

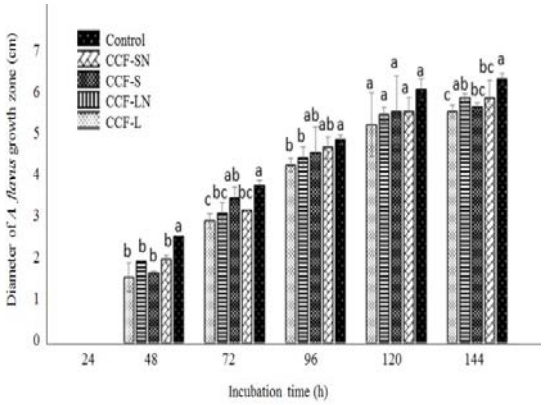

Fig 3 Effects of *L. brevis* isolate CCF on *A. flavus* growth during 144 h incubation. Columns with different letters at each incubation time are significantly different (α<0.05). Abbreviated titles for mentioned CCF are including CCF-L (logarithmic phase, natural pH), CCF-LN (logarithmic phase, neutralized pH), CCF-S (stationary phase, natural pH) and CCF-SN (stationary phase, neutralized pH).

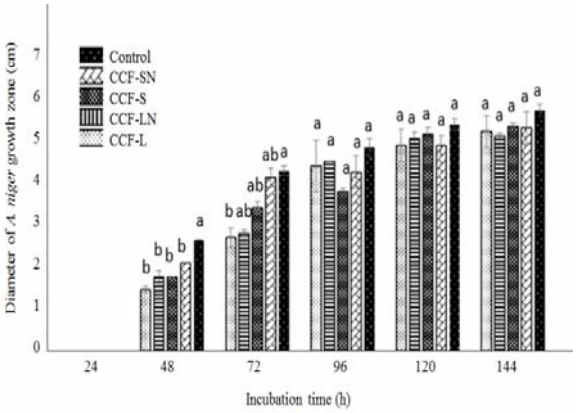

Fig 4 Effects of *L. brevis* isolate CCF on *A. niger* growth during 144 h incubation. Columns with different letters at each incubation time are significantly different (α<0.05). Abbreviated titles for mentioned CCF are including CCF-L (logarithmic phase, natural pH), CCF-LN (logarithmic phase, neutralized pH), CCF-S (stationary phase, natural pH) and CCF-SN (stationary phase, neutralized pH).

نمونه حاوی پالیده خام فاز لگاریتمی در هر دو قارچ بیشترین تاثیر بازدارندگی را در تمامی ساعات گرمخانه‌گذاری داشت. در هر دو قارچ در روز دوم (۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری) همه نمونه‌ها با نمونه کنترل دارای اختلاف معنی‌دار بودند (α<۰/۰۵) در حالی که در مورد *آسپرژیلوس نایجر* پس از ۷۲ ساعت، اختلاف معنی‌داری بین هیچ‌یک از نمونه‌ها با یکدیگر و با نمونه کنترل مشاهده نشد (α>۰/۰۵). نرخ رشد کپک

آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس فلاووس همواره در تیمار کنترل بالاتر بود و در روز ششم تمام سطح پلیت کنترل را پوشاند. احمد و همکاران (۲۰۱۳) بیان کردند که متابولیت‌های دارای وزن مولکولی پایین تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، داری خاصیت ضد قارچی هستند اما متابولیت‌های دارای تاثیر ضد قارچی قوی‌تری نسبت به این ترکیبات نیز وجود دارد [۳۰]. اسوانتروم و همکاران (۲۰۱۳) نیز در ارزیابی خاصیت ضد قارچی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در برابر *آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس فلاووس*، دو ترکیب جدید phenyllactic acid (PLA) و hydroxy (OH-PLA) ٤-phenyllactic را شناسایی نمودند. بر اساس گزارش این محققان، PLA در پالیده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* دارای فعالیت ضد قارچی قابل ملاحظه‌ای بود و مقدار کمتر از ۷/۵ میلی‌گرم آن در هر میلی‌لیتر موجب ۹۰ درصد ممانعت از رشد *آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس فلاووس* شد. باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های موجود در انواع خمیرترش مطرح بوده و با تولید ترکیبات ضد میکروبی مانند اسیدهای آلی، دی استیل، استون، پر اکسید هیدروژن، روتروسایکلین، پپتیدهای ضد قارچی، باکتریوسین‌ها و اثر متقابل این ترکیبات قادر هستند میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد را کنترل نمایند [۳٦].

۵- نتیجه‌گیری

هر روزه گزارش‌های بیشتری از مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها ارائه می‌شود و فساد میکروبی مواد غذایی ناشی از این میکروارگانیسم‌ها نیز کاهش ارزش غذایی محصول و خسارات اقتصادی فراوانی را در پی دارد. لذا شناسایی و معرفی ترکیبات جایگزین نظیر نگهدارنده‌های زیستی رو به گسترش است. از سوی دیگر باید خاطر نشان نمود که تاکنون جداسازی فلور میکروبی خمیرترش از آرد جو و ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی این جدایه‌ها در حوزه صنایع غذایی کشور گزارش نشده است. همچنین مطالعات محدودی در این خصوص در دنیا به اجرا در آمده که نیاز به پژوهش‌های بیشتر در این زمینه را نشان می‌دهد. خمیرترش آرد کامل جو می‌تواند یک منبع مناسب برای جداسازی آغازگرهایی همچون *لاکتوباسیلوس برویس* و دستیابی به پالیده‌های کشت آن با قابلیت ضد میکروبی برای استفاده به عنوان نگهدارنده زیستی باشد. این بازدارنده‌های طبیعی می‌توانند جایگزین مواد نگهدارنده شیمیایی گردند که عموما استفاده از آنها عوارض جانبی در پی دارد. در دهه‌های اخیر مشخص شده است که فعالیت بازدارندگی باکتری‌های اسید لاکتیک و پالیده‌های حاصل از کشت آنها به سیستم‌های پیچیده آنتاگونیستی ارتباط دارد که ماحصل اثر متقابل اسیدهای آلی با سایر ترکیبات ضد میکروبی است. در پژوهش حاضر، تاثیر ضد میکروبی جدایه *لاکتوباسیلوس برویس* مورد تایید قرار گرفت. علاوه بر این، پالیده خام حاصل از فاز رشد لگاریتمی جدایه مذکور، اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی قوی‌تری نسبت به سایر پالیده‌ها داشت که امکان استفاده از جدایه مذکور و پالیده‌های کشت آن را به عنوان یک نگهدارنده زیستی در صنایع دارویی و غذایی نشان می‌دهد.

٦- منابع

[1] Gaggiano, M., Di Cagno, R., De Angelis, M., Arnault, P., Tossut, P., Fox, P. and Gobbetti, M. 2007. Defined multi-species semi-liquid ready-to-use sourdough starter. Food Microbiology, 24: 15–24.

[2] Devuyst, L. and Vancanneyt, M. 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. Food Microbiology, 24: 120–127.

[3] Brandt M.J. 2007. Sourdough products for convenient use in baking. Food Microbiology, 24: 161–164.

[4] Hansen, A and P, Schieberle. 2005. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation. Trends in Food Science and Technology, 16: 85–96.

[5] Clarke, C. and Arendt, E.K. 2005. A review of the application of sourdough technology to wheat breads. Advance in Food and Nutrition Research, 49: 137–156.

[6] Zannini, E., Garofalo, C., Aquilanti, L., Santarelli, S. and Silvestri, G. 2009. Microbiological and technological characterization of sourdoughs destined for bread-making with barley flour. Food Microbiology, 26: 744–753.

[7] Klewicki, R. and Klewicka, E. 2004. Antagonistic activity of lactic acid bacteria as probiotics against selected bacteria of the *Enterobacteriacae* family in the presence polyols and their galactosyl derivertives. Biotechnology letters, 26: 317–320.

[8] Katina, K., Sauri, M., Alakomi, H.L and Mattila-Sandholm, T. 2002. Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. LWT-Food Science and Technology, 35: 38–45.

[9] Corsetti, A., Settanni, L., Sinderen, D., Felis, G., Dellagio, F. and Gobbetti, M. 2005. *Lactobacillus rossii* sp. novel isolated from wheat sourdough. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55: 35–40.

[10] Simsek, O., Hilmi Con, A. and Tulumoglu, S. 2006. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. Food Control, 17: 263–270.

[11] Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J.M., Ivano I. and Dousset, X. 1999. Detection and characterization of a novel antibacterial substance product by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. International Journal of Food Microbiology, 48: 167–177.

[12] Mentes, Ö., Ercan, R. and Akcelik, M. 2007. Inhibitor activity of two *Lactobacillus* strain, isolated from sourdough, against rop-forming *Bacillus* strains. Food Control, 18: 359–363.

[13] AACC International. 2010. AACC methods 46-30. Approved methods of the American association of cereal chemists. 11th Ed. St. Paul, MN.

[14] Ferchichi, M., Valcheva, R., Vost, H., Onno, B. and Dousset, X. 2007. Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. Food Microbiology, 24: 678–686.

[15] Holzapfel, W.H., Habere, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. and Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. The American Journal of Clinical Nutrition, 73: 365–373.

[16] Walter, J., Hertel, C., Tannock, G.W., Lis, C.M., Munro, K. and Hammes, W.P. 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus, Leuconostoc* and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 67: 2578–2585.

[17] Gulahmadov, S.G., Abdulleava, N.F., Kuliev A.A., Ivanova I.V., Dalgalarondo, M., Chobert J.M.,
Haertlee T. (2009). Isolation an

[17] Gulahmadov S.G., Abdullaeva N.F., Guseinova N.F., Kuliev A.A., Ivanova I.V., Dalgalarondo M., Chobert J.M. and Haertlee T. 2009. Isolation and characterization of bacteriocin-like inhibitory substances from lactic acid bacteria isolated from Azerbaijan cheeses. Applied Biochemistry and Microbiology, 45: 266–271.

[18] Jorgensen J.H. and Ferraro M.J. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clinical Infectious Diseases, 49: 1749–1755.

[19] Yang, E.J., Chang, H.C. 2010. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. International Journal of Food Microbiology, 129: 56–63.

[20] Lavermicocca, P., Valerio, F., Visconti, A. 2003. Antifungal activity of phenyl lactic acid against molds isolated from bakery products. Applied and Environmental Microbiology, 69: 634–640.

[21] Wang, H., Yan, Y., Wang, J., Zhang, H. and Qi, W. 2012. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. Plos One, 7: 1–7.

[22] Magnusson, J., and Schnu, J. 2001 . *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Applied and Environmental Microbiology, 67: 1–5.

[23] Gobbetti, M., Corsetti, A. and Rossi, J. 1994. The sourdough microflora Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. Applied Microbiology and Biotechnology, 10: 275–279.

[24] Wood, B.J. and Holzapfel, W.H. 1995. The lactic Acid Bacteria in contemporary perspective: The Genera of Lactic Acid Bacteria, 1 st (Ed). Chapman and Hall, 1–6.

[25] Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. and Onilude, A.A. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. African Journal of Biotechnology, 28: 219–227.

[26] Kiaii, E., Amir Mozafari, N., Samioladab, H. and Jandaghi, N. 2006. Antagonismic affect of isolated lactic acid bacteria from yoghourt against pathogeic bacteria. Gorgan medical journal, 1: 28–33.

[27] Manini, F., Casiraghi, M.C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D. and Plumed-Ferrer, C. 2016. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. LWT - Food Science and Technology, 66: 275–283.

[28] Voysey, P.A. and Hammond, J.C. 2007. Reduced-additive bread making technology. Smith, J. (Ed). Technology of Reduced Additive Foods. Blackie Academic and Professional, 80–94

[29] Thompson, J.M., Waltes, W.M. and Fodd, C.E. 1998. Detection of rope spoilage in bread caused by *Bacillus* species. Journal of Applied Microbiology, 85: 481–486.

[30] Ahmad, R.I., Seo, B.J., Rejish Kumar, V.J., Choi, U.H., Choi, K.H., Lim, J.H. and Park, Y.H. 2003. Isolation and characterization of a proteinaceous antifunal compounds from *Lactobacillus plantarum* YML007 and its application as a food preservative. Letter in Applied Microbiology, 57: 69–67.

[31] Gupta, R. and Srivastava, S. 2014. Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. Food Microbiology, 42: 1–7.

[32] Toba, T., Yoshioka, E., Itoh, T. 1991. Acidophilucin A, a new heat labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. Letter in Applied Microbiology. 13: 106–108.

[33] Tharmaraj, N. and Shah, N.P. 2009. Antimicrobial effect of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in chees-based dips. International Food Research Journal, 16: 261–276.

[34] Crowley, S., Mahony, J. and Van Sinderen, D., 2012, Comparative analysis of two antifungal *Lactobacillus plantarum* isolates and their application as bioprotectants in refrigerated foods. Journal of Applied Microbiology, 113: 1417–1427.

[35] Coda, R., Cassone, A., Rizzello, C., Nionelli, L., Cardinali, G. and Gobbetti, M. 2011. Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: Identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. Applied and Environmental Microbiology, 77: 3484–3492.

[36] Svantrom, A., Boveri, S., Bosrtom, E. and Melin, P. 2013. The lactic acid bacteria metabolite phenyl lactic acid and inhibits both radial growth and sporulation of filamentous fungi. BioMedical Central Research Notes, 6: 464.

Evaluating the antimicrobial properties of *Lactobacillus brevis* isolated from whole barley sourdough

Kia Daliri, F.[1], Sadeghi, A.[1*], Khomeiri, M.[1], Kashaninejad, M.[1], Aalami, M.[1]

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

(Received: 2016/04/27 Accepted:2016/09/11)

In this study after molecular identification of dominant *Lactobacillus* isolated from whole barley sourdough, antimicrobial properties of the isolate and it's cell free culture filtrate (CCF) as native (natural pH) and neutralized obtained from logarithmic and stationary phases against some of food borne bacteria and fungi were investigated. For statistical analysis a completely randomized design with factorial arrangement was used. By sequencing of specific PCR products, mentioned isolate was identified as *Lactobacillus brevis*. For evaluation of antibacterial properties of the isolate, disc diffusion and microdilution and also for antifungal study, overlay and agar spore spot methods were used. Based on the results of disc diffusion, the highest and lowest antagonistic effects of *L. brevis* were observed against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli,* respectively. According to microdilution results, the highest effect of CCF on indicator bacteria was also observed in native CCF obtained from *L. brevis* logarithmic phase which reduced 79.55% of *B. subtilis* population. Furthermore, antifungal activity of *L. brevis* against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* was confirmed based on results of overlay method. The antifungal activity of the isolate was not different significantly ($\alpha<0.05$). Native CCF obtained from *L. brevis* logarithmic phase in comparison to other CCF, was significantly ($\alpha<0.05$) effective on mentioned fungi in agar spore spot assay.

Key words: *Lactobacillus brevis***,** Whole barley sourdough, Antimicrobial properties, Cell free culture filtrate.

*Corresponding Author E-Mail Address: sadeghi.gau@gmail.com