

جداسازی، شناسایی مولکولی و ارزیابی ایمنی باکتری های اسید لاکتیک پروتئولیتیک به دست آمده از نمونه های مختلف شیر خام

علی مویدی^{۱*}، ماندانا محمودی^۲، مرتضی خمیری^۳، شهرام لقمان^۴

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

۲- دانش آموخته دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران.

۴- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۰۴)

چکیده

برخی از باکتری های اسید لاکتیک موجود در شیر خام به ویژه انواع پروتئولیتیک، خصوصیات تکنولوژیک مفیدی دارند و نقش مهمی در توسعه ویژگی های محصول نهایی بازی می کنند، اما غالباً در طی فراوری از بین می روند. از این رو، جداسازی و نگهداری آنها به منظور کاربردهای بعدی ارزشمند خواهد بود. در این پژوهش، پس از جداسازی باکتری های اسید لاکتیک موجود در شیر خام گاو، گوسفند و بز بر روی محیط های کشت MRS agar و M17 agar، جدایه های گرم مثبت و کاتالاز منفی انتخاب شده و از نظر فعالیت پروتئولیتیکی روی محیط Skim milk agar غربال شدند. جدایه های دارای فعالیت پروتئولیتیکی مناسب با استفاده از توالی یابی قطعه ژنی 16S rDNA شناسایی شدند و فعالیت همولیزی و مقاومت آنتی بیوتیکی آنها در برابر ۱۰ آنتی بیوتیک رایج مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز توالی یابی با برنامه BLAST منجر به شناسایی *Lactobacillus delbrueckii* (۵ جدایه)، *L. delbrueckii* زیرگونه *bulgaricus*، *L. fermentum*، *L. reuteri*، *L. curvatus*، *L. lactis* زیرگونه *lactis* و *Streptococcus lutetiensis* شد. از میان جدایه های شناسایی شده، *L. lactis* زیرگونه *lactis* پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد با ایجاد قطر هاله ۲۳ میلی متر بیشترین فعالیت پروتئولیزی را نشان داد. در مورد فعالیت همولیزی، فقط *Lactobacillus fermentum* فعالیت آلفا-همولیزی نشان داد و سایر باکتری ها غیرهمولیتیک بودند. تمام جدایه های شناسایی شده به تراسایکلین، آمپی سیلین، اریترومیسین، ونکومایسین و جنتامایسین حساس بودند به جز *L. reuteri* و *Lactococcus lactis* زیرگونه *lactis* که به ترتیب به ونکومایسین و جنتامایسین مقاوم بودند. در مورد مقاومت به پنی سیلین، کلرآمفنیکول، کلیندامایسین، کانامایسین و استرپتومایسین نتایج بسته به نژاد مورد بررسی متفاوت بود. نتایج این پروژه، نشان دهنده تنوع نژادهای باکتری های اسید لاکتیک پروتئولیتیک در شیر خام است. به علاوه، اگرچه باکتری های اسید لاکتیک ایمن در نظر گرفته می شوند و در لیست GRAS قرار دارند، اما نژادهای وحشی جداسازی شده از شیر خام باید از نظر جنبه های مرتبط با ایمنی مورد بررسی قرار گیرند.

کلید واژگان: باکتری های اسید لاکتیک، شیر خام، فعالیت پروتئولیتیکی، ایمنی

* مسئول مکاتبات: amoayedi1984@gmail.com

۱- مقدمه

باکتری‌های اسید لاکتیک گروه هتروژنی از باکتری‌های گرم مثبت، غیر اسپورزا، کاتالاز منفی و بی‌هوازی اختیاری هستند که از دیدگاه بیوتکنولوژی پتانسیل بالایی در تولید مواد غذایی به‌ویژه فرآورده‌های لبنی تخمیر شده دارند [۱]. محققان زیادی به شناسایی و بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی و عملکردی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از مواد غذایی تخمیری سنتی پرداخته‌اند [۲-۴]. آسپری و همکاران (۲۰۱۷)، تنوع، جنبه‌های تکنولوژیک و ایمنی و پتانسیل پروبیوتیکی *Enterococcus* های جدا شده از شیر الاغ را بررسی کردند. این مطالعه نشان داد که عمده آنها به آنتی‌بیوتیک‌های درمانی مهم (از جمله ونکومايسين) حساس بوده و در اندکی از جدایه‌ها ژن‌های تهاجمی وجود دارد [۵]. بررسی ویژگی‌های تکنولوژیک *Lactococcus* ها و *Enterococcus* های مولد باکتریوسین که از شیر خام بز جداسازی شده بودند نشان داد که *Lactococcus lactis* زیرگونه *lactis* و سه نژاد *Enterococcus faecalis* فعالیت پروتئولیتیکی بالایی دارند [۶].

در فرآیندهای تخمیری شیر، سیستم پروتئولیتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک نقش کلیدی ایفا می‌کند زیرا این سیستم، باکتری‌ها را قادر می‌سازد تا با غلبه بر کمبود اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدها در شیر رشد کنند و تخمیر انجام دهند [۷]. سیستم پروتئولیتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک حاوی پروتئیناز متصل به دیواره سلولی و چندین پپتیداز داخل سلولی است [۸]. پروتئینازهای این گروه از باکتری‌ها از جمله پروتئینازهای *Lactococcus lactis*، الیگوپپتیدهای فعال بیولوژیک از α و β -کازئین‌ها تولید می‌کنند که فعالیت‌های متعددی از جمله تعدیل سیستم ایمنی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد سرطانی و مهار آنزیم مبدل آنژیوتنسن دارند [۷، ۹].

شیر خام دارای تنوع گسترده‌ای از باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد که ثابت شده است برخی از آنها ویژگی‌های مطلوبی در تولید محصولات لبنی تخمیری به‌ویژه پنیر دارند [۱۰]. شرایط تولید، فصل و گونه دام می‌تواند فراوانی و تنوع زیستی باکتری‌های اسید لاکتیک شیر خام را تحت تاثیر قرار دهد ضمن اینکه

خصوصیات باکتری‌های جدا شده نیز متفاوت می‌باشد. به‌طور مثال دیده شده است که تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک دارای خاصیت ضدقارچی در شیر گاو بسیار بیشتر از شیر گوسفند بوده است [۱۱]. مطالعات قبلی تنوع زیستی باکتری‌های اسید لاکتیک شیر خام گوسفند، گاو و بز را نشان می‌دهند [۱۲]. محققان طی مطالعه تنوع زیستی به کمک تکنیک RAPD-PCR و بررسی پتانسیل تکنولوژیک باکتری‌های اسید لاکتیک وحشی جدا شده از شیر خام گاو مشاهده کردند که لاکتوکوکوس، انتروکوکوس و استرپتوکوکوس در شیر خام گاو غالب بود در حالی که لاکتوباسیلوس‌ها، لاکونوستوک‌ها و پدیوکوکوس‌ها در مقادیر کم یافت شدند [۱۰].

امروزه بخش عمده‌ای از فرآورده‌های لبنی تخمیر شده با استفاده از کشت‌های آغازگر شناخته شده تولید می‌شوند که یکی از اهداف اصلی استفاده از این کشت‌ها، اسیدی کردن سریع محیط شیر است. به‌دنبال اسیدی شدن سریع محیط شیر، باکتری‌های اسید لاکتیک طبیعی شیر از بین می‌روند [۱۰]. علاوه بر این به‌دنبال فرآیندهای سالم‌سازی شیر (پاستوریزاسیون) نیز بخش عمده‌ای از باکتری‌های اسید لاکتیک از بین می‌روند. این در حالی است که باکتری‌های اسید لاکتیک طبیعی شیر خام پتانسیل بالایی در فرایند پروتئولیز، تولید باکتریوسین، فعالیت ضد قارچی و ... دارند و در صورت استفاده به عنوان کشت‌های کمکی می‌توانند در تولید محصولی با کیفیت بالا و ویژگی‌های سلامتی بخش مثبت واقع شوند [۱۳].

با توجه به تنوع نژادهای وحشی باکتری‌های اسید لاکتیک و امکان یافتن نژادهای جدید با ویژگی‌های پروبیوتیکی و عملکردی بالقوه از مواد غذایی تخمیری سنتی و نیز وارداتی بودن آغازگرهای مورد استفاده در صنعت لبنیات کشورمان، جداسازی و شناسایی این باکتری‌ها از منابع سنتی جهت تولید محصولات لبنی ضروری به نظر می‌رسد. در این راستا فرقانی و همکاران (۱۳۸۹) تنوع ارزشمندی از باکتری‌های اسید لاکتیک را در شیر خام گاو در البرز مرکزی یافتند. گزارش داده شد که تقریباً همه جدایه‌ها کاربرد صنعتی داشته و می‌توانند جایگزین سویه‌های وارداتی شوند [۱۴].

در اغلب مطالعات، باکتری‌های اسید لاکتیک از فرآورده‌های تهیه شده از شیر خام جداسازی و شناسایی شده‌اند اما در ارتباط

گذاری شدند. تک کلنی‌های رشد یافته روی پلیت آگار بر اساس ویژگی‌های ظاهری متمایز شدند، هر کلنی به صورت جداگانه در پلیت‌های جدید حاوی محیط کشت مربوطه (MRS agar یا M17 agar) کشت داده شد و تحت شرایط بی‌هوازی در دمای مورد نظر گرمخانه‌گذاری گردید. سپس کلنی‌های خالص رشد یافته روی پلیت آگار در مراحل اولیه با رنگ‌آمیزی گرم و فعالیت کاتالازی از یکدیگر متمایز شدند. جدایه‌هایی که در رنگ‌آمیزی گرم، مثبت و از نظر فعالیت کاتالازی، منفی بودند به منظور بررسی فعالیت پروتئولیتیکی و شناسایی مولکولی تا سطح گونه انتخاب شدند. برای نگهداری کوتاه مدت جدایه‌ها از محیط کشت MRS آگار و M17 آگار در لوله شیب‌دار استفاده شد. جهت تهیه کلکسیون و نگهداری طولانی مدت، از محیط کشت MRS و گلیسرول ۴۰ درصد استفاده گردید و پس از انتقال به لوله‌های استریل ۲ میلی‌لیتری مخصوص درپوش دار در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد و نگهداری شد [۲].

۲-۳- تعیین فعالیت پروتئولیتیکی جدایه‌ها

فعالیت پروتئولیتیکی جدایه‌ها به روش چاهک و با استفاده از محیط کشت Skim milk agar بررسی شد. بدین منظور، چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر در محیط کشت ایجاد گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه ۱۶-۱۲ ساعته (در فاز لگاریتمی) هر یک از جدایه‌ها به چاهک‌ها تزریق شد. سپس پلیت‌ها به مدت یک ساعت در دمای محیط نگهداشته شدند تا انتشار باکتری به خوبی در محیط کشت انجام شود. پس از آن، پلیت‌ها گرمخانه‌گذاری شدند. قطر هاله پس از ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد [۱].

۲-۴- شناسایی جدایه‌ها به روش مولکولی

۲-۴-۱- استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

استخراج DNA به کمک کیت تجاری استخراج DNA، بر اساس دستورالعمل کیت مورد استفاده انجام شد. DNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت شناسایی مولکولی باکتری‌های اسید لاکتیک به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، از آغازگرهای عمومی رفت و برگشت باکتری‌های اسید لاکتیک، برای تکثیر قطعه‌ای از ژن S DNA^{۱۶S} استفاده شد. توالی آغازگرها عبارت بودند از

با باکتری‌های اسید لاکتیک شیر خام، مطالعات اندک است. جداسازی باکتری‌های لاکتیکی از شیر خام در مقایسه با جداسازی از محصولاتی مانند پنیر رسیده، این مزیت را دارد که امکان انتخاب بهتری از باکتری‌های اسید لاکتیک در سطح گونه و نژاد فراهم می‌شود [۱۰]. نظر به اهمیت فعالیت گونه‌های میکروبی پروتئولیتیک، این پژوهش با هدف جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک پروتئولیتیک از نمونه‌های مختلف شیر خام و بررسی تنوع و فراوانی آنها صورت گرفت. همچنین برخی جنبه‌های ایمنی آن‌ها از جمله فعالیت همولیتیک و مقاومت آنتی-بیوتیکی جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- محیط‌های کشت، مواد شیمیایی و مواد

ژنتیکی مورد استفاده

محیط‌های کشت MRS agar، M17 agar، Skim milk agar، Blood agar، و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از جمله گلیسرول، هیدروکسید سدیم و ... از شرکت مرک آلمان تهیه شد. دیسک‌های آنتی بیوتیک از شرکت پادتن طب ایران، کیت استخراج DNA از شرکت یکتا تجهیز آزما (ایران)، مستر میکس و آغازگرهای مورد استفاده در شناسایی ژنتیکی از شرکت ماکروژن (کره جنوبی) خریداری شدند.

۲-۲- جمع‌آوری نمونه‌ها و جداسازی اولیه

نمونه‌های شیر خام گاو، گوسفند و بز از شهرستان گرگان جمع‌آوری و در ظروف استریل و درون جعبه‌های حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل و در همان روز جهت جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک استفاده شدند. جهت جداسازی، ۱۰۰ میکرولیتر شیر خام اولیه و ۱۰۰ میکرولیتر شیر رقیق شده (با غلظت ۰/۱ نمونه اصلی) به صورت جداگانه روی محیط‌های MRS agar و M17 agar کشت سطحی داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک مزوفیل و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴۶ درجه سانتی‌گراد جهت جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک ترموفیل تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از گازپک گرمخانه-

میکروگرم (آمی سیلین، پنی سیلین، استرپتومایسین و جنتامایسین) و ۲ میکروگرم (کلیندامایسین) بودند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، قطر هاله عدم رشد اندازه گیری شد. نتایج بر اساس CLSI (۲۰۱۳) به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش شد [۱۶].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- جداسازی باکتری های اسید لاکتیک و بررسی

فعالیت پروتئولیتیکی آنها

در مجموع ۳۰ کلنی متفاوت در پلیت های کشت شناسایی و پس از خالص سازی از نظر فعالیت کاتالازی بررسی شدند. از این تعداد ۱۵ جدایه کاتالاز منفی بودند که جهت بررسی های بیشتر (رنگ آمیزی گرم) و فعالیت پروتئولیزی انتخاب شدند. در رنگ آمیزی گرم تمام جدایه ها گرم مثبت و شامل مورفولوژی های گوناگون میله ای بلند، میله ای کوتاه، بیضی شکل، کروی و بودند. فعالیت پروتئولیتیکی ۱۵ جدایه کاتالاز منفی و گرم مثبت با اندازه گیری قطر هاله اطراف چاهک در پلیت Skim milk agar و مقایسه آنها بررسی شد (جدول ۱). همان طور که در جدول ۱ مشاهده می شود جدایه با کد BRM3 جداسازی شده از شیر خام گاو بالاترین فعالیت پروتئولیتیک را در محیط skim milk agar نشان داد. در حالی که جدایه با کد SRM3 جداسازی شده از شیر خام گوسفند کمترین فعالیت پروتئولیزی را داشت. لازم به ذکر است جدایه با کد BRM2 اگرچه فعالیت پروتئولیتیکی مطلوبی نشان می داد اما رشد مناسبی در محیط کشت نداشت و بنابراین مورد شناسایی ژنومی قرار نگرفت. جدایه با کد SRM3 نیز رشد مطلوبی نداشت ضمن اینکه از نظر فعالیت پروتئولیزی نیز ضعیف بود و بنابراین مورد شناسایی ژنومی قرار نگرفت.

وویلرمد و همکاران (۱۹۸۶) بیان کردند که زمانی یک نژاد باکتریایی "پروتئولیتیک" نامیده می شود که بتواند بر روی پلیت هاله شفاف پروتئولیز بین ۱۵ و ۲۱ میلی متر ایجاد کند [۱۷]. اگرچه گفته شده است چنانچه نسبت قطر هاله روشن به قطر کلنی بیش از ۱/۵ باشد، میکروارگانیزم مذکور فعالیت پروتئولیتیکی نسبتا بالا دارد [۱۸].

1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'
27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
طول قطعه DNA تکثیر شده ۱۵۰۰bp بود. واکنش PCR در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر و با برنامه دمایی مشابه با روش توصیف شده توسط لیت و همکاران (۲۰۱۵) انجام گرفت [۱۵]. جهت آنالیز کیفی واکنش PCR، محصولات تکثیر شده توسط ترموسایکلر، روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند و در مقایسه با مارکر DNA طول قطعه ژنی تعیین گردید [۱۵].

۲-۴-۲- تعیین توالی و مقایسه توالی ها

جهت تعیین توالی، محصولات واکنش PCR پس از خالص سازی به شرکت ماکروژن در کره جنوبی ارسال شدند. توالی های بدست آمده با کمک برنامه BLAST با توالی های موجود در بانک جهانی ژن (NCBI) مقایسه شدند. جدایه هایی که توالی آنها با موارد موجود در بانک اطلاعاتی، درصد مشابهت بالاتری نشان دادند به عنوان همان گونه شناسایی شدند.

۲-۵- فعالیت همولیتیکی

تولید همولیزین توسط جدایه ها بر روی محیط کشت Blood agar حاوی ۵ درصد خون گوسفند بررسی شد. برای این منظور، باکتری های فعال بصورت خطی روی پلیت کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری مورد بررسی قرار گرفتند. پیدایش هاله های روشن یا سبز به ترتیب به عنوان فعالیت بتاهمولیتیک یا آلفاهمولیتیک گزارش شد. لازم به ذکر است از *E. coli* به عنوان باکتری کنترل مثبت استفاده شد [۲].

۲-۶- تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها به آنتی بیوتیک های رایج با روش انتشار دیسک آنتی بیوتیک های مربوطه ارزیابی شد. جهت این کار، ابتدا جدایه های مختلف در محیط MRS مایع در ۳۷ درجه سانتی گراد رشد داده شدند و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از کشت فعال روی محیط MRS آگار کشت سطحی داده شد. در مرحله بعد، دیسک های آنتی بیوتیک به کمک پنس استریل روی سطح محیط آگاردار مذکور قرار داده شدند و پلیت ها تحت شرایط بی هوازی در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. دیسک های آنتی بیوتیک حاوی غلظت های ۳۰ میکروگرم (کلرامفنیکول، کانامایسین، ونکومایسین، اریترومایسین، تتراسایکلین)، ۱۰

Table 1 Molecular identification and proteolytic activity of lactic acid bacteria isolated from different raw milk

Clear zone on Skim milk agar (mm)	Identitiy (%)	Molecular identification	source	code	Nu.
15	98	<i>Lactobacillus delbruekii</i>	cow	BRM1	1
20	98	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	cow	BMM1	2
14	98	<i>L. delbruekii</i>	goat	ORM1	3
12	97	<i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	goat	ORM3	4
14	99	<i>Lactobacillus curvatus</i>	goat	ORM4	5
23	99	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	cow	BRM3	6
15	98	<i>L. delbruekii</i>	goat	ORT2	7
19	97	<i>L. delbruekii</i>	goat	ORT3	8
17	99	<i>L. delbruekii</i>	cow	BRT1	9
12	98	<i>Lactobacillus fermentum</i>	cow	BRT4	10
11	99	<i>Lactobacillus reuteri</i>	ewe	SRM2	11
20	-	-	cow	BRM2	12
8	-	-	ewe	SRM3	13

۳-۳- شناسایی ژنومی جدایه‌ها

نظر به اعتبار و دقت شناسایی‌های صورت گرفته با استفاده از تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA، پژوهش‌های متعددی در دنیا جهت شناسایی نژادهای مختلف باکتریایی از منابع مختلف غذایی صورت گرفته است. لیت و همکاران (۲۰۱۵)، نژادهای مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده از دانه‌های کفیر در برزیل را با استفاده از این تکنیک شناسایی و ویژگی‌های پروبیوتیکی آنها را مورد بررسی قرار دادند و جدایه‌های مختلفی از *Lactobacillus* و *Leuconostoc Lactococcus* شناسایی کردند [۱۵]. همچنین، تولینی و همکاران (۲۰۱۶)، جدایه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک بدست آمده از نمونه‌های مختلف شیر گاو و بوفالو و پنیر تهیه شده از آنها را از نظر فعالیت ضدباکتریایی و پروتئولیتیکی غربال نموده و با تکثیر قطعه ژنی 16S rDNA مورد شناسایی قرار دادند [۱]. همچنین محققان با هدف بررسی خواص پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از شیر شتر توانستند ۶ جدایه متعلق به *Lactobacillus plantarum* و *Lactococcus lactis* را به کمک توالی‌یابی قطعه ژنی 16S rRNA شناسایی کنند [۴].

شناسایی ژنومی جدایه‌ها بر اساس توالی قطعه مشخصی از ژن 16S rDNA و مقایسه آن با توالی‌های ژنومی ثبت شده صورت گرفت. شکل ۱ نشان دهنده ژل الکتروفورز محصولات PCR مربوط به جدایه‌های پروتئولیتیک منتخب می‌باشد که تایید کننده تکثیر مطلوب قطعه ژنی مورد نظر است. چنانچه در شکل مذکور مشخص است، محصولات PCR مربوط به تمام جدایه‌ها طولی معادل ۱۵۰۰bp داشتند. پس از تکثیر، توالی قطعات ژنی جدایه‌ها با توالی‌های ذخیره شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI، Blast، گردید که نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است. با توجه به اطلاعات جدول مذکور مشاهده شد که نمونه‌های شیر مورد بررسی تنوع گونه‌ای مطلوبی از نظر حضور ۱۱ جدایه باکتری‌های اسید لاکتیک پروتئولیتیک نشان دادند که شامل شش گونه مختلف متعلق به سه جنس متفاوت می‌شد. مقایسه توالی‌ها منجر به شناسایی *Lactobacillus delbruekii*، *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*، *Streptococcus lutetiensis*، *Lactobacillus curvatus*، *Lactobacillus reuteri*، *Lactobacillus fermentum* و *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* گردید.

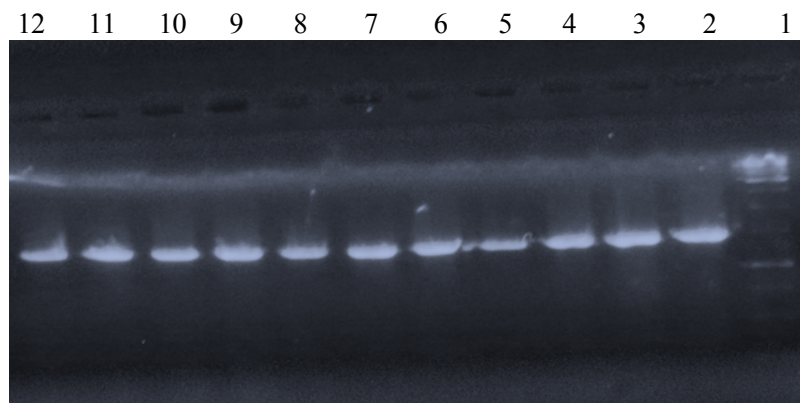


Fig 1 Electropherogram of PCR products from genomic DNA and a marker on Agarose gel (1.5%). Lane 1: marker. Lanes 2 to 12 show PCR products.

دیگری نوع P_{III} که بر روی آلفا، بتا و کاپا-کازئین عمل می‌کند. در *Lc. lactis* subsp. *lactis* نوع P_I مشاهده می‌شود [۲۲]. گونه‌های لاکتوباسیلوس عموماً پروتئولیتیک‌های ضعیفی هستند [۲۱]. اما نژادهایی از *Lactobacillus helveticus* و *L. delbreuckii* subsp. *bulgaricus* فعالیت پروتئولیتیکی مطلوبی نشان داده و بطور موثری توانسته‌اند پروتئین شیر را هیدرولیز نموده و پپتیدهای زیست فعال آزاد نمایند [۲۰]. از بین لاکتوباسیلوس‌های شناسایی شده در مطالعه حاضر، *L. reuteri* کمترین فعالیت پروتئولیتیک را نشان داد که با مطالعات پیشین که در آن‌ها به فعالیت پروتئولیتیک پایین آن اشاره داشته و عنوان شده که رشد کند این گونه در شیر و عدم توانایی آن در اسیدی کردن سریع شیر نیز به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی ضعیف آن می‌باشد، مطابقت دارد [۲۳].

۳-۴- فعالیت همولیتیکی جدایه‌ها

بر طبق (2002) FAO/WHO عدم فعالیت همولیتیکی، یکی از پیش‌نیازهای ایمنی برای انتخاب یک نژاد میکروبی قابل استفاده در غذا است به‌ویژه اگر بنا باشد آن را به عنوان یک نژاد پروبیوتیک معرفی کنیم [۲۴]. با توجه به نتایج حاصل از همولیز، هیچ کدام از جدایه‌های منتخب هنگام رشد در محیط Blood agar موجب هیدرولیز گلبول‌های قرمز خون نشدند و Y- همولیتیک بودند. هرچند یک جدایه به نام *L. fermentum* فعالیت آلفا همولیتیکی نشان داد و از انجام آزمایش‌های بعدی حذف شد. این نتیجه حاکی از آن است که از ۱۱ جدایه توالی‌یابی شده، یک جدایه ایمن نبوده و ۱۰ جدایه

با توجه به نتایج توالی‌یابی و ارزیابی فعالیت پروتئولیتیکی روی محیط Skim milk agar، مشاهده می‌شود که *Lc. lactis* subsp. *Lactis* (با ایجاد قطر هاله ۲۳ میلی‌متر) دارای بیشترین فعالیت پروتئولیزی بوده است و پس از آن *Lactobacillus delbreuckii* جداشده از شیر بز (قطر هاله ۱۹ میلی‌متر) و شیر گاو (قطر هاله ۱۷ میلی‌متر) بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی را داشته‌اند. در برخی مطالعات قبلی نیز فعالیت پروتئولیتیکی سویه‌های مختلف *Lc. lactis* subsp. *lactis* در مقایسه با بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک قابل توجه بوده است [۱۹]. [۲۰]. لاکتوکوکوس‌ها جهت رشد نیازمند اسیدهای آمینه متعددی هستند که برای آنها ضروری یا محرک رشد به شمار می‌روند. از طرفی در شیر مقادیر محدود و اندکی اسیدهای آمینه آزاد یا اولیگوپپتید وجود دارد. به‌دلیل این محدودیت منبع نیتروژن، چنانچه این باکتری نتواند یک سیستم پروتئولیتیکی جهت شکستن کازئین شیر تامین کند، رشد آن در شیر به سرعت متوقف می‌شود و نمی‌تواند به عنوان یک آغازگر موفق مورد استفاده قرار گیرد [۲۱]. پروتئینازهای متصل به دیواره سلولی مرحله نخست تجزیه کازئین را انجام می‌دهند. در سویه‌های مختلف *Lc. lactis* این پروتئینازها، سرین پروتئینازهایی با pH بهینه حدود ۶ هستند. سیستم پروتئولیتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک‌ها از جمله *Lc. lactis* به طور گسترده توسط پژوهشگران مورد مطالعه قرار گرفته است. بر اساس نوع فعالیت دو نوع از این پروتئینازها از یکدیگر متمایز می‌شوند. یکی، پروتئیناز نوع P_I که عمدتاً بر روی بتا-کازئین عمل می‌کند و

[۲۸].

۳-۵- بررسی حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک

حساسیت و مقاومت جدایه‌های لاکتیکی در مقابل ۱۰ آنتی‌بیوتیک مهارکننده سنتز پروتئین و مهارکننده دیواره سلولی در جدول ۲ نشان داده شده است. لازم به ذکر است *Streptococcus lutetiensis* با کد BMM1 و *L. delbruekii* با کد ORM1 به دلیل عدم رشد کافی از آزمون مقاومت به آنتی-بیوتیک حذف شدند.

منتخب، غیر بیماری‌زا می‌باشند. نتایج به دست آمده از این تحقیق با یافته‌های تجرو-سارینا (۲۰۱۲) مطابقت دارد [۲۵]. همچنین اووسو-کارتنگ و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که از بین ۱۶ نژاد *L. fermentum* جدا شده از خمیر ارزن تخمیری، دو جدایه آلفا همولیز بودند [۲۶]. در حالی که محمودی و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند از میان ۱۴ *L. fermentum* به دست آمده از شیر خام شتر همگی γ -همولیتیک بودند [۲۷]. همچنین در تحقیقات ماراکوداکیسا و همکاران (۲۰۰۶)، هیچ کدام از گونه‌های *Lactobacillus* جدا شده از فرآورده‌های لبنی فعالیت β -همولیتیک نشان ندادند و همگی γ -همولیتیک بودند.

Table 2 Antibiotic sensitivity of isolated lactic acid bacteria

										Clear zone (mm)	Antibiotic isolate
clindamycin	erithromycin	Kanamycin	gentamicin	Streptomycin	vancomycin	chloramphenicol	ampicilin	penicilline	tetracyclin		
22 S	25 S	23 S	20 S	15 S	24 S	17 I	20 S	20 S	20 S	<i>L. delbruekii</i> (BRM1)	
20 I	26 S	0 R	17 S	0 R	20 S	0 R	29 S	0 R	28 S	<i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (ORM3)	
22 S	20 I	0 R	20 S	0 R	24 S	0 R	25 S	0 R	20 S	<i>L. curvatus</i> (ORM4)	
27 S	25 S	0 R	12 R	0 R	18 S	18 S	30 S	0 R	20 S	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (BRM3)	
19 I	27 S	13 R	15 S	15 S	24 S	۲۱ S	27 S	30 S	25 S	<i>L. delbruekii</i> (ORT2)	
38 S	24 S	20 S	19 S	18 S	30 S	۱۷ I	34 S	18 S	28 S	<i>L. delbruekii</i> (ORT3)	
22 S	28 S	24 S	17 S	15 S	20 S	۲۲ S	19 S	15 S	27 S	<i>L. delbruekii</i> BRT1	
24 S	26 S	0 R	18 S	0 R	0 R	۲۰ S	25 S	33 S	20 S	<i>L. reuteri</i> SRM2	

S: sensitive, I: semi-sensitive, R: resistant

ویژگی اغلب ذاتی و غیر قابل انتقال است. هرچند برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک مانند بعضی از نژادهای *L. reuteri* و *L. plantarum fermentum* احتمال دارد حامل ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک قابل انتقال کد شده روی پلاسמיד باشند. انتقال ژن‌های مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک به باکتری‌های بیماری‌زای رودهای، دغدغه اصلی برای سلامتی

در میان جدایه‌ها، *L. delbruekii* (BRM1) و *L. delbruekii* (BRT1) (ORT3) به ۱۰ آنتی‌بیوتیک مورد آزمون حساس بودند و *L. delbruekii* (ORT2)، فقط به کانامایسین مقاومت نشان داد. چنانچه در مطالعات مختلف گزارش شده‌است می‌توان گفت بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشند. این

لاکتوباسیلوس های جدا شده از مواد غذایی تخمیری مختلف مانند *L. bulgaricus* و *L. paracasei* جدا شده از انواع ماست، *L. delbrueckii* subsp. *lactis*، *L. helveticus*، *L. rhamnosus*، *L. casei* و *L. fermentum* جدا شده از پنیر گزارش شده است که در تطابق با نتایج این تحقیق می باشد. مقاومت ذاتی به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی در گونه های *Lactobacillus* می تواند به عدم وجود سیستم انتقال الکترون وابسته به سیتوکروم و همچنین به تغییرات در نفوذپذیری غشا مرتبط باشد [۳۱].

به طور کلی، گونه های *Lactobacillus* به بسیاری از مهارکننده های سنتز دیواره سلولی مانند پنی سیلین ها حساس هستند. هرچند مقاومت گسترده ای در مقابل پنی سیلین ها خصوصاً پنی سیلین G در لاکتوباسیلوس های مورد استفاده تحت عنوان پروبیوتیک یا کشت های آغازگر، در *L. rhamnosus*، *L. reuteri* و *L. plantarum* جدا شده از پنیر، در *delbrueckii* subsp. *bulgaricus* جدا شده از انواع ماست چینی و در *L. curvatus* و *L. sakei* از سوسیس های خشک تخمیری و غیره مشاهده شده است [۳۱]. مشابه این نتایج، در پژوهش حاضر نیز دیده شد که برخی از جدایه ها به پنی سیلین مقاومت نشان دادند.

نژادهای مختلف *Lc. lactis* معمولاً به آنتی بیوتیک های گرم مثبت از جمله اریترومايسين و ونکومايسين و همچنین به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف مانند کلرامفنیکول، پنی سیلین و آمپی سیلین حساس هستند [۳۲]. این در حالی است که اغلب گونه های لاکتوکوکوس به جتتامایسین و کانامایسین مقاوم اند [۳۲]. چنین الگوی مقاومت یا حساسیت دقیقاً در مطالعه حاضر در مورد *Lc. lactis* subsp. *lactis* نیز مشاهده گردید.

۴- نتیجه گیری کلی

در این مطالعه با بهره گیری از تکنیک های مولکولی، باکتری های اسید لاکتیک دارای فعالیت پروتئولیتیکی مناسب از نمونه های مختلف شیر خام گاو، گوسفند و بز جداسازی و شناسایی شدند. با توجه به تنوع زیستی و شدت فعالیت پروتئولیتیکی مشاهده شده، ایجاد مجموعه ای از آغازگرهای پروتئولیتیک که بتوانند در

است. هر نژادی که دارای پلاسمیدهای مقاومت به آنتی بیوتیک باشد جهت استفاده به عنوان پروبیوتیک های انسانی و حیوانی نامناسب در نظر گرفته می شوند. از طرف دیگر، نژادهای پروبیوتیک دارای مقاومت ذاتی به آنتی بیوتیک ممکن است برای بیمارانی که با مصرف داروهای ضد میکروبی مختلف، دچار کاهش یا عدم تعادل در میکروفلور نرمال روده ای می شوند، مفید باشد [۲۹]. لیت و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش کردند که نژادهای *Lactobacillus* جدا شده از دانه های کفیر نسبت به تمام آنتی بیوتیک ها به جز ونکومايسين حساسیت نشان دادند. این درحالی است که تمام جدایه های مطالعه حاضر به جز *Lactobacillus reuteri* SRM2 به ونکومايسين حساسیت نشان دادند [۱۵]. در میان مقاومت های آنتی بیوتیکی، مقاومت به ونکومايسين، از همه مهمتر است زیرا ونکومايسين یکی از آخرین آنتی بیوتیک هایی است که در مقابل عفونت های بالینی ایجاد شده توسط پاتوژن های مقاوم به چندین دارو، کارایی گسترده ای دارد. با این حال برخی از باکتری های اسید لاکتیک مانند نژادهای *L. plantarum*، *L. rhamnosus*، *L. casei*، *pediococci* و *Leuconostoc* به ونکومايسين مقاوم هستند که این ژن مقاومت، روی کروموزوم کد شده و غیر قابل انتقال می باشد [۲۹]. بر خلاف نتایج تحقیق حاضر، اکثر گونه های *Lactobacillus* حامل ژن مقاومت به ونکومايسين روی کروموزوم هستند و چنین مقاومت ذاتی به دلیل وجود دی-آلانین دی-لاکتات به جای دی پتید دی-آلانین دی-آلانین در پتیدوگلیکان آن ها است [۳۰]. در تحقیقات ماراکوداکیسا و همکاران (۲۰۰۶) نیز ۲۵ نژاد به ونکومايسين مقاوم و ۴ نژاد از *L. paracasei* و *L. rhamnosus* به این آنتی بیوتیک حساس بودند [۲۸]. همچنین در مطالعات فرانسوی و همکاران (۲۰۰۹) نژادهای *Lac. lactis* و *Lac. lactis* subsp. *lactis* و *subsp. cremoris* به ونکومايسين حساس بودند [۱۰] که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* (ORM3)
Lac. lactis subsp. *lactis curvatus* (ORM4)
 (BRM3) و *L. reuteri* (SRM2) به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی مقاومت نشان دادند. مقاومت به آمینوگلیکوزیدها (جتتامایسین، کانامایسین و استرپتومايسين) در

- Enterococcus diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control*, 73: 81-90.
- [6] Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, M., Henni, D. E., Kihal, M. 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*. 21 (5): 579-588.
- [7] Savijoki, K., Ingmer, H., and Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 394-406.
- [8] Georgala, A.K., Tsakalidou, E., Kandaraki, I., 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 delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, Isolated from Traditional Greek Yoghurt. *Food Science and technology international*. 3 (3): 259-263.
- [9] Soleymanzadeh, N., Mirdamadi, S., and Kianirad, M. 2016. Antioxidant activity of camel and bovine milk fermented by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented camel milk (Chal). *Dairy Science & Technology*. 96: 443-457.
- [10] Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., and Poznanski, E. 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*. 19: 3-11.
- [11] Delavenne, E., Mounier, J., Déniel, F., Barbier, G., and Le Blay, G. 2012. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *International Journal of Food Microbiology*. 155: 185-190.
- [12] Medina, R., Katz, M., Gonzalez, S., Oliver, G. 2001. Characterization of the Lactic Acid Bacteria in Ewe's Milk and Cheese from Northwest Argentina. *Journal of Food Protection*, 64 (4): 559-563
- [13] Wouters, J., Ayad E., Hugenholtz, J., Smit, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*. 12 (2-3): 91-109.
- [14] Forghani, F., Nazemi, A., Sharifi, S., Eskandari, M. 2010. Isolation and Molecular identification of Lactic Acid Bacteria of Raw Milks from Central Alborz. *Journal of Microbial Biotechnology*, 5 (2): 21-28. (In Persian)
- [15] Leite, A. M. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, M. 2017. Evaluation of the proteolytic activity of lactic acid bacteria isolated from raw milk of different species of goats. *Food Science and Technology*. 38: 1-7.
- مقیاس صنعتی به عنوان کشت‌های آغازگر یا همراه مورد استفاده قرار گیرند امکان‌پذیر و حائز اهمیت خواهد بود. با این وجود به دلیل اینکه برخی از ویژگی‌های تکنولوژیک باکتری‌های اسید لاکتیک وابسته به نژاد می‌باشد، جداسازی چنین باکتری‌هایی از مناطق مختلف کشور پیشنهاد می‌گردد. همچنین بر اساس نتایج این مطالعه، بررسی جنبه‌های ایمنی باکتری‌های جدا شده امری ضروری خواهد بود.
- ### ۵- سپاسگزاری
- یافته‌های این مقاله از طرح پژوهشی با شناسه ۳۳-۳۵۴-۹۵ استخراج شده است. بدینوسیله، نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان جهت حمایت مالی طرح مذکور تشکر و قدردانی می‌نمایند.
- ### ۶- منابع
- [1] Tulini, F.L., Hymery, N., Haertlé, T., Le Blay, G., and De Martinis, E.C.P. 2016. Screening for antimicrobial and proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from cow, buffalo and goat milk and cheeses marketed in the southeast region of Brazil. *Journal of Dairy Research*, 83, 115-124.
- [2] Shahrampour, D., Khomeiri, M., Kashiri, M., Razavi, S. A. 2019. Evaluation of Antibacterial and Antifungal activity of Indigenous *Lactobacillus plantarum* isolated from various foods. *Modares Journal of Food Science and Technology*, 85 (15): 327-336. (In Persian)
- [3] Zoumpopoulou, G., Tzouvanou, A., Mavrogonatou, E., Alexandraki, V., Georgalaki, M., Anastasiou, R., Papadelli, M., Manolopoulou, E., Kazou, M., & Kletsas, D., Papadimitriou, K., and Tsakalidou, E. 2017. Probiotic Features of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Diverse Pool of Traditional Greek Dairy Products Regarding Specific Strain-Host Interactions. *probiotics and antimicrobial proteins*. 10 (2): 313-322.
- [4] Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N.P. and Ayyash, M. 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT - Food Science and Technology*, 79: 316-325
- [5] Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill, C. 2017. Raw donkey milk as a source of

- London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.
- [25] Tejero-Sariñena, S., Barlowb, J., Costabile, A., Gibson, G.R., and Rowland, I. 2012. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*. 18: 530-538.
- [26] Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Akabanda, F., and Jespersen, L. 2015. Technological properties and probiotic potential of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from West African fermented millet dough. *BMC Microbiology*. 15: 261-270. .
- [27] Mahmoudi, I., Ben Moussaa, O., Moulouk Khaldi, T. E., Kebouchib, M., Soligot, C., 341 Le Roux, Y. and Hassouna, M. 2016. Functional in vitro screening of *Lactobacillus* 342 strains isolated from Tunisian camel raw milk toward their selection as probiotic. *Small Ruminant Research*, 137: 91-98.
- [28] Maragkoudakisa, P. A., Zoumpopouloua, G., Miarisa, C., Kalantzopouloua, G., Potb, 345 B. and Tsakalidoua, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from 346 dairy products. *International Dairy Journal*, 16: 189-199.
- [29] Zhoua, J.S., Pillidgec, C.J., Gopalc, P.K., and Gill, H.S. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 211 – 217.
- [30] Ammor, M.S., Flórez, A. B., Van Hoek, A.H.A.M., Reyes-Gavilan, C.G.D.L., Aarts, H.J. M., Margolles, A., & Mayo, B. (2008). Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 14: 6–15.
- [31] Abriouel, H., Muñoz, M.C.C., Lerma, L.L., Montoro, B.P., Bockelmann, W., Pichner, R., Kabisch, J., Cho, G.S., Franz, C.M.A.P., Gálvez, A., and Benomar, N. 2015. New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. *Food Research International*, 78: 465-481.
- [32] Ammor, M.S., Flórez, A. B., Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24: 559-570. bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24: 559-570.
- R. S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V. M. F., Mayo, B., and Delgado, S. 2015. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science*. 98:3622–3632.
- [16] CLSI. 2013. “Disc diffusion supplemental tables” Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Adapted in part from CLSI document M100-S23 (M02-A11); Wayne, PA 19807: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [17] Vuilleumard, J. C., Amiot, J, and Gauthier, S. 1986. Evaluation de l’activite proteolytique de bacteries lactiques par une methode de diffusion sur plaque. *Microbiology-Aliments-Nutrition* 3 327–332.
- [18] Lawalat, H. J., Satiman, U. 2015. Identification of Lactic Acid Bacteria Proteolytic Isolated from An Indonesian Traditional Fermented Fish Sauce Bakasang by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA). *International Journal of ChemTech Research*, 8 (12): 630-636.
- [19] Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., Dary-Mourot, A. 2014. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Research International*. 63, 71-80.
- [20] Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I., 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.
- [21] Barrangou, R., Lahtinen, S. J., Ibrahim, F., Ouwehand, A. C. Genus *Lactobacillus*. In: Lahtinen et al. (Editors). *Lactic acid bacteria; Microbiological and functional aspects*. 4nd edition. CRC press. 2012. P, 81.
- [22] Tan, P. S. T., Poolman, B., Konings, W. N. 1993. Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Research*. 60: 269-286.
- [23] Hidalgo-Morales, M., Robles-Olvera, V., García, H. S. 2005. *Lactobacillus reuteri* β -galactosidase activity and low milk acidification ability. *Canadian journal of microbiology*, 51(3), 261-267.
- [24] FAO/WHO, 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food

Isolation, molecular identification and safety assessment of proteolytic lactic acid bacteria obtained from different raw milks

Moayedi, A. ^{1*}, Mahmoudi, M. ², Khomeiri, M. ³, Loghman, Sh. ⁴

1. Assistant professor, Department of food science and technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Ph.D. Graduate, Department of food science and technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. Associate professor, Department of food science and technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
4. M.Sc. Graduate, Department of food science and technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

(Received: 2019/03/17 Accepted:2019/05/25)

Some lactic acid bacteria (LAB), in particular proteolytic strains, in raw milk have useful technological properties and play important role in developing desired characteristics in the final products. However, they are mostly lost during heating and technological processes. Therefore, it would be important to be isolated and maintained for further applications as pure adjunct cultures. In this study, after selective isolation of LAB from raw cow's, ewe's and goat's milks on MRS agar and M17 agar, gram-positive catalase-negative were selected and maintained as pure cultures. Then, the isolates were screened according to their proteolytic activities on skim milk agar (well-diffusion method). The potent gram-positive, catalase-negative proteolytic strains were identified via 16S rDNA gene sequencing and antibiotic resistance (10 antibiotic agents, disc-diffusion method) and hemolytic activities (on blood agar containing 5% sheep blood) were evaluated. BLAST analysis resulted in identification of *Lactobacillus delbruekii* (five isolates), *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. curvatus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, and *Streptococcus lutetiensis*. *L. lactis* subsp. *lactis* obtained from cow milk showed the highest proteolytic activity as a 23-mm halo zone was observed on skim milk agar plate after 48 h incubation at 37 °C. In case of hemolysin production, only *Lactobacillus fermentum* showed α -hemolytic activity and the others showed no activities. All the identified isolates were sensitive to tetracycline, ampicillin, erythromycin, vancomycin and gentamycin with the exception of *L. reuteri* and *lactococcus lactis* subsp. *lactis* that found to be resistant to vancomycin and gentamycin, respectively. About penicillin, chloramphenicol, clindamycin, kanamycin and streptomycin, the results were varied. Our results verified diversity of wild proteolytic LAB strains in raw milk, as reported before. Although LAB mainly belong to the GRAS list, strains isolated from raw milk should be re-checked for their safety-related properties.

Keywords: Raw milk, Proteolysis, Lactic acid bacteria, Safety

*Corresponding Author E-Mail Address: amoayedi@ut.ac.ir