

## شناسایی مخمرهای ایزوله شده از خمیر ترش‌های بومی ایران با استفاده از تکنیک پی سی آر

محمد جواد اکبریان میمند<sup>۱</sup>، مرتضی خمیری<sup>۲\*</sup>، علیرضا صادقی ماهونک<sup>۲</sup>، مهران اعلمی<sup>۲</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۲۴)

### چکیده

خمیر ترش، خمیری است که از آب و آرد تشکیل شده است و میکروارگانیسم‌های اصلی آن باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها هستند. فرایند تخمیر خمیر ترش بر پایه تخمیر لاکتیکی و الکلی است که به ترتیب توسط باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها انجام می‌شود. هم‌چنین این میکروارگانیسم‌ها نقش مهمی در بهبود طعم، بافت و ماندگاری فرآورده‌های نانوائی ایفا می‌کنند. در این پژوهش، نمونه‌های خمیر ترش جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران به منظور بررسی فلور مخمری، مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت رسیدن به این هدف، مخمرها با روش مورفولوژی کلنی جداسازی و سپس جهت شناسایی دقیق با جفت آغازگرهای عمومی قارچ‌ها، ژن ۲۶S rRNAs تکثیر داده شد. قطعاتی که تکثیر شدند، پس از خالص‌سازی به منظور توالی‌یابی به شرکت بیوساینس انگلستان ارسال شد. سپس با مقایسه توالی‌های حاصل با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی ژنتیک (NCBI)، گونه‌ی مخمرهای مورد مطالعه شناسایی شدند. نتایج نشان داد که مخمرهای ایزوله شده شامل ساکارومایسس سرویزیه، ساکارومایسس اگزیزگوس، ایساتچینیکا اورنتالیس، تورولوسپورا فرانسیسکا، تورولوسپورا دلبروکی و پیشیا فرمنتاس بودند که گونه‌های غالب مربوط به ساکارومایسس سرویزیه و ساکارومایسس اگزیزگوس بودند.

کلید واژگان: خمیر ترش، روش مورفولوژی کلنی، ژن ۲۶S rRNAs، مخمر.

\*مسئول مکاتبات: khomeiri@gau.ac.ir

## ۱- مقدمه

خمیر ترش یک سیستم بیولوژیکی بسیار پیچیده است و اساس تشکیل آن هم‌زیستی بین فلور میکروبی آرد و کشت‌های تجاری لاکتوباسیلوس<sup>۱</sup> می‌باشد که به‌عنوان آغازگر اختصاصی و به‌دلایل خاص مانند بهبود آروما و طعم، افزایش زمان ماندگاری، ارزش تغذیه‌ای و یا حتی ایجاد خواص سلامتی بخش در فرآیند تخمیر نان مورد استفاده قرار می‌گیرد. در خمیرترش بر اساس اثر متقابل اسید لاکتیک باکتری‌ها و مخمرها، ترکیبات فعال عطر و طعم تولید می‌شود. اسید لاکتیک باکتری‌های هتروفرمنتاتیو عمدتاً اتیل استات، الکل‌های معین و آلدئیدها را تولید می‌کنند، در حالی‌که اسید لاکتیک باکتری‌های هموفرمنتاتیو، دی استیل و دیگر کربونیل‌ها را سنتز می‌کنند. در تخمیر مخمری ایزوالکل‌ها تولید می‌شوند که شاید در تولید عطر و طعم نهایی محصول مشارکت کمی داشته باشند. فروکتوز، گلوکز یا سیترات موجود در خمیر نیز می‌توانند مشارکت اسید لاکتیک باکتری‌ها را در تشکیل مواد فرار در پخت را افزایش دهند. البته واکنش‌های مایلارد و کاراملیزاسیون نیز در عطر و طعم محصولات نانوائی دخالت دارند [۱].

مهم‌ترین وظیفه‌ای که مخمرها در تهیه نان دارند، پوک کردن محصول از طریق متابولیسم مخمرها و ایجاد گاز دی‌اکسید کربن می‌باشد. علاوه بر این مخمرها الکل، آلدئید و اسیدهای آلی نیز تولید می‌کنند که در تشکیل عطر و بوی نان و محصولات پخت اثر می‌گذارند. مخمرهای موجود در خمیرترش، بر باکتری‌های گرم منفی که از طریق آلودگی آرد یا خمیر ترش وارد خمیر می‌شوند، اثر آنتی‌بیوتیکی دارند. این مخمرها از نظر سیستماتیک دارای گروه یکسانی نیستند و در بین آن‌ها گونه‌های مختلف

ساکارومایسس<sup>۱</sup>، ترولوپسیس<sup>۲</sup>، تورولا<sup>۳</sup>، مایکوتورولا<sup>۴</sup>، مایکودرما<sup>۵</sup> و هانسول<sup>۶</sup> نیز می‌توانند فعالیت کنند [۲].

امروزه ابزارهای جدیدی برای طبقه‌بندی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک در حال جایگزین شدن هستند که روش‌های قدیمی که بر پایه فنوتیپ بودند را تکمیل می‌سازند. برای کاربردهای روزمره، مطمئن‌ترین روش، توالی‌یابی ژن *S rRNA* ۱۶ بر پایه‌ی PCR و الگوهای پروتئین محلول است. برای تعیین موقعیت فیلوژنیک گونه‌ها و جنس‌ها، RNA ریبوزومی (*rRNA*) مناسب‌تر است؛ زیرا این توالی هم دارای نواحی کاملاً حفظ شده و هم نواحی کمتر حفاظت شده می‌باشد. در حال حاضر، تعیین توالی *rRNA* باکتری‌ها کار نسبتاً آسانی است. تاکسونومی کنونی تا میزان زیادی بر اساس روابط فیلوژنیک استوار است که براساس کار توالی‌های ژنتیکی حاصل شده است [۳].

در گذشته برای تعیین توالی این ژن از روش نسخه‌برداری معکوس استفاده می‌شد [۴] اما امروزه تعیین توالی این ژن‌ها، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) صورت می‌گیرد [۵]. مقایسه این توالی‌ها، قدرتمندترین و صحیح‌ترین تکنیک را برای تعیین روابط فیلوژنیک میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌آورد [۶]. یکی از مزایای مهم این روش، شناسایی و توصیف دقیق جنس‌های جدید می‌باشد [۷].

هدف از این پژوهش شناسایی مخمرهای ایزوله شده از خمیرترش‌های ایرانی که از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شدند، بود.

## ۲- مواد و روش

## ۲-۱- مواد

موادی که در این پژوهش استفاده شدند شامل محیط کشت‌های Y.G.C آگار، YM برات، بافرتریس بورات اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (TBA)، کلروفرم، اتانول و مسترمیکس بودند.

1. *Saccharomyces cerevisiae*
2. *Torulopsis*
3. *Torula*
4. *Mycotorula*
5. *Mycoderma*
6. *Hansenula*

1. *Lactobacillus*

## ۲-۲- روش آماده‌سازی نمونه‌های خمیر ترش

نمونه‌های خمیر ترش از نواحی مختلف ایران شامل گنبد، گرگان، مشهد، همدان، شهربابک، کرمان، لار، تهران، شهرکرد و زاهدان جمع آوری و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس طی دو مرحله و در شرایط استریل فعال سازی شدند. بدین منظور نمونه‌های خمیر ترش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرم خانه‌گذاری شدند. پس از آن ۱۰ گرم از هر نمونه خمیر ترش در شرایط استریل با ۹۰ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی (۸/۵ گرم کلرید سدیم در لیتر) مخلوط و یکنواخت گردید و در دستگاه استومیکر (مدل سیوارد، ساخت کشور انگلستان) به مدت ۱ دقیقه و با دور نرمال هموزن گردید. سپس محلول رویی به‌عنوان رقت  $10^{-1}$  برای تهیه رقت‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. رقت‌های  $10^{-2}$  تا  $10^{-5}$  در محلول کلرید سدیم ۱۰۰ درصد تهیه شد. آزمایشات فوق در دو تکرار انجام شدند (۸،۹ و ۱۰).

## ۲-۳- روش کشت

به‌منظور کشت باکتری و مخمرها از روش کشت سطحی استفاده شد. در این روش ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت تهیه شده به وسیله سمپلر بر سطح محیط Y.G.C آگار تزریق و سپس با میله‌ی شیشه‌ای پخش شد. پس از خشک شدن، پلیت در شرایط هوایی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری گردید [۱۱].

## ۲-۴- استخراج DNA از جدایه‌های مخمری

به‌منظور استخراج DNA از کلونی‌های تک خالص‌سازی شده، از کیت‌های استخراج DNA (U.S.A, Fermentas) استفاده شد. بدین صورت که:

۱- ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم از سلول‌های باکتریایی در ۲۰۰ میکرولیتر بافر تریس اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (TE بافر)<sup>۱</sup> حل شد

۲- ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۴۰۰ میکرولیتر از lysis solution مخلوط و در دمای ۶۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۵ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری شد.

۳- فوراً ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و با ۳ تا ۵ بار زیر و رو کردن آرام مخلوط امولسیفیه شد و نمونه در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد.

۴- آماده کردن precipitation solution (بدین منظور ۷۲۰ میکرولیتر از آب دیونیزه استریل با ۸۰ میکرولیتر supplied 10X concentrated Precipitation Solution) مخلوط شد.

۵- قسمت آبی بالایی (سوپرناتانت) حاوی DNA را به یک تیوب جدید انتقال داده و ۸۰۰ میکرولیتر از محلول تازه آماده شده مرحله ۳ به آن اضافه شد. مخلوط به آرامی با زیر و رو کردن به مدت ۱ تا ۲ دقیقه در دمای اتاق هم زده و در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد.

۶- سوپرناتانت به‌طور کامل جدا شد و رسوب DNA به آرامی در ۱۰۰ میکرولیتر از محلول NaCl حل شد.

۷- ۳۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق را اضافه و اجازه داده شد تا DNA رسوب کرده (۱۰ دقیقه در ۲۰- درجه سلسیوس) و سپس به مدت ۳ تا ۴ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۳ تا ۴ دقیقه سانتریفوژ و اتانول حذف شد.

۸- غلظت DNA به‌وسیله اسپکترومتر و هم‌چنین به‌صورت چشمی در ژل آگار اندازه‌گیری شد (کیت فرمتاز).

## ۲-۵- واکنش PCR

واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر با مقادیر بهینه شده‌ی جدول ۱ انجام پذیرفت. پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن F 5GCATAT CAATAA GCG شامل ۲۶ S rRNA و 3' GAG GAA AAG 3' و 5' GGT CCG TGT TTC و 3' AAG ACG G 3' بودند [۱۲].

1. Trisethylene diamine tetra acetic acid buffer

جدول ۱ میزان مواد استفاده شده در واکنش PCR

مقدار	مواد
۲۵ میکرو لیتر	مستر میکس (۲X)
۱ - ۰/۱ میکرومول	پرایمر رفت
۱ - ۰/۱ میکرومول	پرایمر برگشت
۱۰ پیکومول - ۱ میکرومول	DNA الگو
رسیدن به حجم ۵۰ میکرو لیتر	آب مقطر
۵۰ میکرو لیتر	حجم نهایی

پس از اضافه کردن هر یک از اجزای مخلوط واکنش، میکروتیوپ‌ها در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند و برنامه

دمایی به صورت جدول ۲ تنظیم گردید.

جدول ۲ مراحل انجام واکنش PCR

تعداد سیکل	زمان	دما درجه سلسیوس	مراحل
۱	۳ دقیقه	۹۵	دناتورهدناولیه
	۴۰ ثانیه	۹۵	دناتوره شدن
۲۵-۴۰	۴۰ ثانیه	۴۵	اتصال پرایمرها
	۳ دقیقه	۷۲	طویل شدن
۱	۱۵ دقیقه	۷۲	طویل شدن نهایی

معادل ۵ میلی‌متر و رنگ سفید و کرم بودند انتخاب و سپس رنگ‌آمیزی شدند و کلنی‌هایی که مطابق شکل زیر بودند جهت شناسایی تکمیلی انتخاب شدند.

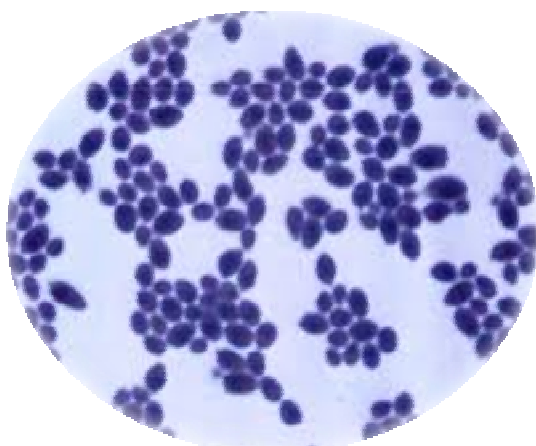
برای مشاهده نتایج واکنش PCR پس از بار گذاری واکنش‌های PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد، الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ ولت و به مدت ۳۵ دقیقه انجام شد (۱۳).

### ۲-۶- تعیین توالی و مقایسه توالی‌ها

جهت تعیین توالی ژن‌های حاصل از رشد جدایه‌ها، واکنش‌های PCR به شرکت بیوساینس انگلستان ارسال گردید. از پرایمر F جهت تعیین توالی استفاده شد. با کمک برنامه BLAST توالی‌های حاصل با توالی‌های موجود در بانک ژنی (NCBI) مقایسه شدند. جدایه‌هایی که توالی‌شان با موارد موجود در سایت بانک اطلاعاتی ژنتیک (NCBI)، ۹۷ درصد یا به‌میزان بالاتری مشابهت نشان دادند به‌عنوان همان گونه شناسایی شدند.

### ۳- بحث و نتایج

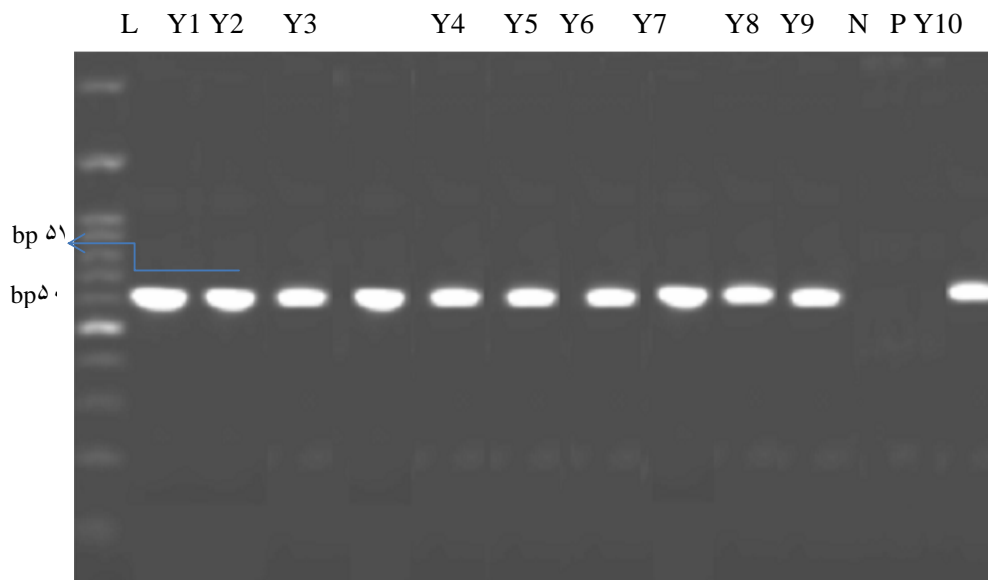
در این پژوهش پس از کشت رقت‌های تهیه شده، نمونه‌هایی که دارای کلنی‌های صاف، گنبدی یا کروی شکل و دارای قطری



شکل ۱ تصویر مخمرهای شناسایی شده زیر میکروسکوپ با بزرگ-نمایی ۱۰۰ X

داده شدند که نتایج حاصل در شکل ۲ آورده شده است.

پس از به دست آوردن کلنی خالص DNA، نمونه‌ها استخراج و سپس در واکنش PCR توسط پرایمرهای عمومی قارچ‌ها تکثیر



شکل ۲ تصویر آمپلیکون‌های ۵۷۵ bp حاصل از واکنش PCR ۲۶S rRNA در ژل الکتروفورز از سمت چپ: L - نردبان ژنتیکی، Y1-Y10 - جدایه‌ها، NC - کنترل منفی و NP - کنترل مثبت

وایست و نیسنز (۲۰۰۵) در تحقیقی حضور مخمرهای ساکارومایسس، تورولوسپورا، کاندیدا در خمیر ترش نان پانتون<sup>۷</sup> را نشان دادند (۱۴). ورنوچی و همکاران (۲۰۰۴) موفق به جداسازی و شناسایی مخمرهای کاندیدا مایلری<sup>۸</sup> و ساکارومایسس سرویزیه در طول فرایند تولید نان کلومبا<sup>۹</sup> بوسیله RAPD-PCR شدند [۱۵].

کاتینا (۲۰۰۵) گونه‌های مختلفی از مخمر را از خمیر ترش ایزوله کرد که گونه‌های غالب آن‌ها ساکارومایسس و پیشیا بودند [۱۶].

پس از انجام واکنش PCR، فرآورده‌های واکنش جهت تعیین توالی به شرکت بیوساینس انگلستان ارسال گردید. نتایج حاصل از تعیین توالی با اطلاعات موجود در بانک اطلاعات NCBA مقایسه شد که بلاست توالی ۲۶rRNAs نمونه Y3 با توالی موجود در بانک اطلاعاتی ژنتیک (NCBI) در شکل ۳ آورده شده است. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود نتایج حاصل نشان داد که مخمرهای ایزوله شده مربوط به ساکارومایسس سرویزیه، ساکارومایسس اگزیکوس<sup>۱</sup>، ایساتچنیکا اورنتالیس<sup>۲</sup>، تورولوسپورا فرانسیسکا<sup>۳</sup>، تورولوسپورا دلبروکی<sup>۴</sup>، پیشیا فرمتاس<sup>۵</sup> و کاندیدا پاراروگوسا<sup>۶</sup> بودند.

1. *Saccharomyces exiguous*
2. *Issatchenkiaorientalis*
3. *Torulasporafrancisciae*
4. *Torulasporadelbrueckii*
5. *Pichia fermentans*
6. *Candida pararugosa*

7. Panettone
8. *Candidamillieri*
9. Caelumba

جدول ۳ شناسایی مخمرهای ایزوله شده براساس ناحیه ۲۶s rRNA

نام گونه شناسایی شده	کد ثبت شده NCBI	درصد شباهت با زنجیره ثبت شده در NCBI	منطقه جمع آوری	کد ایزوله
<i>Issatchenkia orientalis</i>	AY305680.1	۹۹	گنبد	Y1
<i>Torulospora franciscaae</i>	U73604.1	۹۸	زاهدان	Y2
			شهر بابک	Y3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KF141670.1	۱۰۰	شهرکرد	Y5
			گرگان	Y8
<i>Torulosporelbrueckii</i>	JQ965838.1	۹۹	تهران	Y4
<i>Candida pararugosa</i>	AF335972	۹۹	مشهد	Y6
<i>Saccharomyces exigueus</i>	JX645717.1	۹۷	شهر بابک	Y7
			لار	Y9
<i>Pichia fermentans</i>	AY497672	۱۰۰	زاهدان	Y10

Saccharomyces cerevisiae strain QWC\_11 26S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [gb|KF141670.1](#) Length: 565 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1024 bits(554)	0.0	555/556(99%)	0/556(0%)	Plus/Plus
Query 23	GGCGAGTGANGCGGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCCGAGTTGTA	82		
Sbjct 9		68		
Query 83	ATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAAACAGGACGTCAT	142		
Sbjct 69	ATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAAACAGGACGTCAT	128		
Query 143	AGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCCTTTGTAAGTGCCTTCGAAGAGT	202		
Sbjct 129	AGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCCTTTGTAAGTGCCTTCGAAGAGT	188		
Query 203	CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTG	262		
Sbjct 189	CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTG	248		
Query 263	GCGAGAGCCGATAGCGAACAAGTACAGTATGGAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAG	322		
Sbjct 249	GCGAGAGCCGATAGCGAACAAGTACAGTATGGAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAG	308		
Query 323	AGTGAAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGGAAGGGCAATTTGATCAGACATGGTGTITG	382		
Sbjct 309	AGTGAAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGGAAGGGCAATTTGATCAGACATGGTGTITG	368		
Query 383	TGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTG	442		
Sbjct 369	TGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTG	428		
Query 443	GTGGCAGGATAAAATCCATAGGAAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAA	502		
Sbjct 429	GTGGCAGGATAAAATCCATAGGAAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAA	488		
Query 503	TACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGAGGTAAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATA	562		
Sbjct 489	TACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGAGGTAAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATA	548		
Query 563	TGCCGCCCGTCTTGAA	578		
Sbjct 549	TGCCGCCCGTCTTGAA	564		

شکل

۳ بلاست توالی ۲۶srRNA نمونه Y3 با توالی موجود در بانک اطلاعاتی (NCBI)

کاندیدا<sup>۱</sup>، کاندیدا<sup>۲</sup>، کاندیدا<sup>۳</sup>، کاندیدا<sup>۴</sup>، کاندیدا<sup>۵</sup>، کاندیدا<sup>۶</sup>، کاندیدا<sup>۷</sup>، کاندیدا<sup>۸</sup>، کاندیدا<sup>۹</sup>، کاندیدا<sup>۱۰</sup>

کارستی و همکاران (۲۰۰۱) طی تحقیقی به جداسازی و شناسایی مخمرها از خمیرترش‌های گندم پرداختند که نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که مخمرهای جداسازی شده شامل ساکارومایسس سرویزیه، ساکارومایسس اگزیکوس، کاندیدا کروسئی<sup>۱</sup>، ساکارومایسس اینوسیتاز<sup>۲</sup>، کلوکولاسا ترولوپسیس<sup>۳</sup>، ترولوپسیس

1. *collucolasaTorulopsis*
2. *Torulopsis candida*
3. *Candida stellate*
4. *Rodotorulaglutinis*
5. *Candida goilireimondi*
6. *Candida boudini*
7. *Hansenulaanomalla*

1. *Candida krusei*
2. *Saccharomyces inusitas*

- enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Food Science*, 239: 487–494.
- [6] Woesce, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*, 51: 221–271.
- 7- Wallbanks, S., Martinez-Murcia, A. J., Fryer, J.L., Phillips, B. A., and Collins, M. D. 1990. 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococussalmonarium* sp. nov. *Systematic Bacteriology*, 40: 224–230.
- [8] Saeed M., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., and Rehman, S. U. 2009. Isolation and fermentation of sourdough. *Agriculture and biology*. 11: 329-332.
- [9] Lacerda, I. C. A., Miranda, R. L., Borelli, B. M., Nunnes, A. C., Nardi, R. M. D., Lachance, M., and Rosa, C. A. 2005. Lactice acid bacteria and yeast associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava strach in Brazil. *Food Microbiology*. 105: 213-219.
- [10] Luannsakul, N., Keeratipibul, S., Jindamorakot, S., and Tnanasupawat, S. 2009. Lactic acid bacteria and yeasts isolated from the starter doughs for chinese steamed buns in Thailand. *Food Science and Technology*. 42: 1404-1412.
- [11] Torres-Llanez, M. J., Vallejo-Cordoba, B., Diaz-Cinco, M.E, Mazorra-Manzano, M. A., and Gonzalez-Cordoba, A. F. 2006. Chareterization of the natural microflora of artisanal mexicanfersco cheese. *Food Control*. 17: 683-690.
- [12] Angelis, M. De., et al. 2006. Fermentation by selected sourdough lactic acid bacteria to decrease coeliac intolerance to rye flour. *Cereal Science*. 43: 301–314.
- [13] Fell, J., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large - subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50:1351–71.
- [14] Vuyst, L. D., and Neysens, P. 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Food Science and Technology*. 16: 43-56.
- [15] Vernocchi, P., Valmorri, S., Gatto, V., Torriani, S., Gianotti, A., Suzzi, G., Guerzoni, بودند [۱۷]. برندت و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند که فلور مخمیری خمیر ترش اغلب یکنواخت است و به طور کلی مخمرهای خمیرترش مربوط به کاندیدا مایلری یا گونه‌های وابسته به ساکارومایسس سرویزیه است [۱۸].
- ### ۴- نتیجه گیری
- نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که خمیرترش‌های ایرانی یک منبع غنی از مخمر هستند. مخمرهای ایزوله شده و جداسازی شده از خمیرترش‌های جمع آوری شده شامل ساکارومایسس سرویزیه، ساکارومایسس اگزیزگوس، ایساتچنیکا اورنتاليس، تورولوسپورا فرانسیسکا، تورولوسپورا دلبروکی و پیشیا فرمتاس بودند که بیشترین نمونه‌ها مربوط به دو گونه ساکارومایسس سرویزیه و ساکارومایسس اگزیزگوس بودند.
- ### ۵- تشکر و قدردانی
- بدینوسیله نویسندگان از خانم مهندس سمانه فرجی و خانم مهندس نازنین شیرنگی به دلیل همکاری‌هایی که در انجام این تحقیق داشته‌اند کمال تقدیر و تشکر را دارند.
- ### ۶- منابع
- [1] Rehman, S. U., Paterson, A., and Piggott, J. R. 2006. Flavourin sourdough breads: a review. *Food Science and Technology*. 17: 557-566.
- [2] Rajabzadeh, N. 2005. *Breed Technology*. Tehran University Press.
- [3] Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*. Salminen S, von wright A. (3th Edition). Marcel Dekker, New York: 1–72.
- [4] Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., and Pace, N.R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 82: 6955–6959.
- [5] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis K. B., and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed

- [17] Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzi, F., Tosti, N., and Gobbetti, M. 2001. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeast from Italy. *Food Microbiology*.64: 95-104.
- [18] Brandt, M. J. 2007. Sourdough products for convenient use in baking. *Food Microbiology*.24: 161-64.
- M. E., and Gardini, F. 2004. A survey on yeast microbiota associated with an Italian traditional sweet-leavened baked good fermentation. *Food Research International*.37: 469-476.
- [16] Katina, K. 2005. Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread. VTT Biotechnology. VTT Technical Research Centre of Finland, 569: 13-41, 53-75.



## Identification of yeasts isolated from native Iranian sourdough using PCR technique

Akbariyan Meymanad, M. J. <sup>1</sup>, Khomeiri, M. <sup>2\*</sup>, Sadeghi Mahoonak, A. R. <sup>2</sup>, Alami, M. <sup>2</sup>

1. MSc. in Food Science and Technology. Gorgan university of agricultural sciences and natural resources.

2. Associate professor. Department of Food Science and Technology. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

(Received: 93/1/18 Accepted: 93/5/24)

The sourdough is a paste that is made up of water and flour and yeasts and lactic acid bacteria are its key microorganisms. Sourdough fermentation process is based on lactic and alcoholic fermentation that is done by lactic acid bacteria and yeasts respectively. Also these microorganisms play an important role in improving the flavor, texture and shelf life of bakery products. In this research, samples of sourdough were collected from different regions of Iran to verify the yeast flora, were studied. To achieve this aim the yeasts isolated by the colony morphology method and then had reproduced 26S rRNA gene with general primers for identification exactly. The sections that replicated sent to bioscience company UK for Sequencing. Then compare the resulting sequence with sequences in the gene bank (NCBI), the yeast species studied were identified. The results showed that the yeasts isolated included *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus*, *Issatchenkia orientalis*, *Torulaspora franciscae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia fermentans* that dominant species related to *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces exiguus*.

**Keywords:** Sourdough, Colony morphology method, 26S rRNA gene, Yeast.

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: khomeiri@gau.ac.ir