شناسایی جدایه‌های باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس از پنیر متال حاصل از شیر خام به روش های سنتی و مولکولی

فهیمه عزیزی[۱]، محمدباقر حبیبی نجفی[۲*]، محمدرضا عدالتیان[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی،دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۳/۰۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۵/۳۱)

چکیده

باکتری‌های اسید لاکتیک، گروهی از میکروارگانیسم‌های گرم مثبت، غیراسپورزا، به شکل کوکسی یا باسیل هستند. این باکتری‌ها چندین ماده ضد میکروبی مانند باکتریوسین‌ها را تولید می‌کنند. باکتری‌های اسید لاکتیک بویژه سویه‌های جنس لاکتوباسیلوس، رایج ترین میکروارگانیسم‌های موجود در محصولات پروبیوتیک هستند. هدف این پژوهش، جداسازی و شناسایی سویه‌های جنس لاکتوباسیلوس ازفلور میکروبی موجود درشش نمونه پنیر سنتی متال می‌باشد. به منظور دستیابی به این هدف، از میان۱۸۰جدایه باکتری اسید لاکتیک از پنیر متال، ۱۹ ایزوله با استفاده از آزمون‌های تأییدی بیوشیمیایی بعنوان جنس لاکتوباسیلوس انتخاب شد، سپس با استفاده از روش مولکولی تکثیر توالی ژن16s rRNAشناسایی در سطح گونه انجام گرفت. در نهایت گونه‌های*لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کازئی*و*لاکتوباسیلوس بوچنری* به ترتیب ۱۳ ، ٤ ، ۱ و۱جدایه ازمجموع جدایه‌های شناسایی شده را به خود اختصاص دادند. تعیین خصوصیات تکنولوژیکی و پروبیوتیکی بالقوه جدایه ها به منظورمعرفی کاربرد مناسب هر جدایه در دست بررسی است.

کلید واژگان: لاکتوباسیلوس، پنیر متال، 16s rRNA

* مسئول مکاتبات:habibi@um.ac.ir

۱- مقدمه

پنیر، یک واژه عمومیبرای گروهی از محصولات غذایی تخمیری بر پایه شیر است که با طعم، ترکیب و شکل‌های بسیار وسیع و متنوع در سراسر جهان تولید می‌شود[۱]. در بین پنیرهای حاصل از شیر خام، پنیرهای تولید شده از شیر گوسفند به دلیل برخورداری از ترکیب ویژه چربی و پروتئین به ویژه کازئین از مزه، طعم و بافت منحصر بفردی برخوردار هستند. به طور کلی، جمعیت میکروبی پنیرهای حاصل از شیر خام در مقایسه با پنیرهای حاصل از شیر پاستوریزه، متنوع و به شدت متغیر است[۲].درمیان پنیرهای بدون استفاده از استارتر تجاری حاصل از شیرخام،همچون لیقوان و کوزه، عمل اسیدیفیکاسیون[1](اسیدی شدن یاکاهش pH)شیر و رسانیدن پنیر، وابسته به عمل باکتری‌های اسید لاکتیک ذاتی[2] است. عمده تغییر و تبدیلاتی که بافت و مزه خاص این پنیرها را باعث می‌شود، ناشی از فعالیت باکتری‌های اسیدلاکتیک ذاتی است[۳].

پنیر متال نوعی فراورده لبنی پارس آباد دشت مغان است که در برخی از کارگاه های محلـی تولید می شود. در تولید این پنیر هیچ نوع استارتری اسـتفاده نمی‌شود وتنها رنین طبیعی افزوده شده است.

باکتری‌های اسید لاکتیک آغازگر(SLAB[3]) درصورت استفاده، در آغاز فرآیند تولید پنیر، به شیر اضافه می‌شوند. باکتری‌های اسید لاکتیک غیر آغازگر(NSLAB[4])در ماتریکس پنیر در نتیجه آلودگی حین فرآیند تولید یا از محیط به شیر وارد می-شوند[٤].ازنظر صنعتی، کاربرد کشت‌های آغازگر ویژه باعـث ایجـاد کیفیت ثابت در محصـول مـی گـردد ولـی منجـر به از دست رفتن ویژگی‌های منحصر به فرد و اصیل محصولات سنتی خواهد شد.به همین دلیل، جستجو وکاوش سویه‌های وحشی موجود در طبیعـت و نیـز در محصـولات تخمیـری نظیر پنیرهـای حاصـل از شـیر خام که به صورت سنتی تولید می‌شوند، پتانسیل جداسـازی نژادهای جدید جهت تولید فراورده‌های لبنی جدید با طعم طبیعی را دارا می‌باشند[۵؛ ٦؛ ۷]. بدون شک، مهمترین کاربردباکتری‌های اسید لاکتیک، استفاده از آن‌ها به عنوان نژادهای آغازگر در محصولات لبنی است. بخصوص، *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، *لاکتوکوکوس لاکتیس*، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه *بولگاریکوس*، در سطح وسیعی به عنوان آغازگر لبنی استفاده می‌شوند و دارای اهمیت اقتصادی فراوانی هستند[۸]. یکی دیگر از خصوصیات مهم لاکتوباسیل ها تولید عوامل ضد میکروبی نظیر باکتریوسین‌هاست[۹؛ ۱۰].

نقش لاکتوباسیل‌ها در صنعت غذا بسیار مهم ارزیابی شده است، از این رو شناسایی و طبقه‌بندی مولکولی این باکتری‌ها می‌تواند گامی مؤثر در معرفی لاکتوباسیل‌های بومی با خصوصیات عملکردی ویژه و به‌کارگیری آن‌ها در محصولات لبنی صنعتی و تولید محصولات فرا ویژه باشد. لاکتوباسیل‌های مزوفیل، احتمالاً متداولترین باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در پنیر بوده و وسیعترین مطالعات در این گروه، برروی آن‌ها صورت گرفته است[۱۱]. هدف از انجام این مطالعه، جداسازی و شناسایی گونه های مختلف جنس لاکتوباسیلوس از پنیر متال به عنوان پنیر سنتی حاصل از شیر خام و بررسی خصوصیات بالقوه تکنولوژیکی و پروبیوتیکی جدایه‌ها می باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه برداری

در این پژوهش تعداد شش نمونه از پنیر سنتی متال با مدت زمان رسیدن یکسان (۳ماه) از شش کارگاه مختلف در شهر پارس آباد دشت مغان و مستقیماً از خیک‌هابا رعایت اصول بهداشتی گرفته شد. برای نمونه گیری از پنیر، ۲۵ گرم از هر نمونه درون ۲۲۵ میلی لیتر سیترات سدیم ۲٪وزنی- حجمی استریل انتقال یافت و با استفاده از کیسه‌های مخصوص، درون دستگاه استومکر به مدت ۲ دقیقه با چرخش ۲۳۰ دور در دقیقه همگن شد. محلول بدست آمده در واقع دارای رقت 10^{-1} بوده، که در لوله‌های حاوی آب پپتونه ۰/۱٪، تا رقت 10^{-8} رقیق سازی شد[۱۲].

۲-۲- جداسازی و خالص سازی

از تمامی رقت‌های بدست آمده به میزان ۰/۱ میلی لیتر، با دو تکرار بر روی محیط کشت MRS Agarبرای ایزولاسیون لاکتوباسیلوس‌ها، کشت سطحی داده شد. محیط‌های کشت تلقیح شده در دمای۳۷Ċدر دو حالت هوازی و بی هوازی (داخل جاربی هوازی مرک بـه همـراه گـاز پک نوعA) جهت

1. Acidification
2. Indigenous
3. Starter lactic acid bacteria
4. Non Starter Lactic Acid Bacteria

رشد باکتری‌های مزوفیل به مدت ٤٨-٧٢ ساعت گرمخانه گذاری گردید. پس از سپری شدن مدت گرمخانه گذاری و خروج پلیت‌ها از داخل انکوباتور، ابتدا پلیت های حاوی٢٥ تـا ٢٥٠کلنی را شمارش کرده وسپس از پلیت‌های دارای بـالاترین رقت، چند پرگنه به شکل تصادفی و بر اساس تفاوت در ویژگی‌های مورفولوژی آن‌ها(رنگ، شکل، تحدب و تقعر پرگنه و عمقی یا سطحی بودن پرگنه) انتخاب و جهت خالص سازی بیشتر ٢ تـا ٣ مرتبه کشـت خطـی مجـدد داده شد.در مجموع ١٨٠ایزوله بدست آمده از پلیت‌های مورد آزمون در محیط MRS براث حاوی ١٥٪گلیسرول در فریزر٨٠Ċ- نگهداری شد[١٢].

٢-٣- اندازه گیری pH

اندازه گیری pH و شمارش پرگنه‌های مشکوک به باکتری-های اسیدلاکتیک و شمارش کلی برحسب cfu/g

pH نمونه‌های پنیر توسط pHمتر اندازه گیری شد. برای شمارش تعداد کلی باکتری‌های هوازی و مزوفیل از هر رقت ٠/١ میلی لیتر را در محیطBHI آگار به صورت آمیخته[1]کشت سطحی داده و در دمای ٣٥Ċبه مدت ٤٨ ساعت گرمخانه گذاری شد و تعداد کلنی‌های موجود را شمارش نموده و شمارش کلی محاسبه گردید[١٣].به منظور شمارش تعداد کلی باکتری‌های اسیدلاکتیک هوازی و بی هوازی به روش کشت سطحی مشابه شمارش کلی صورت گرفت با این تفاوت که از محیط MRS آگار و گرمخانه گذاری در دمای٣٧Ċ در دو حالت هوازی و بی هوازی استفاده شد.

٢-٤- جداسازی وشناسایی فنوتیپی در سطح جنس

برای انجام آزمون‌های تأییدی بر روی جدایه‌های موجود، پس از تهیه لام و رنگ آمیزی ضمن ثبت ویژگی‌های مورفولوژیکی پرگنه باسیل‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی برای ادامه آزمون انتخاب شدند.سپس ایزوله‌های انتخاب شده از نظررشد در دو دمای١٥ Ċو ٤٥Ċ، رشد در حضورکلرورسدیم با دو غلظت ٦/٥٪ و ١٨٪ ، رشد در pH=٤/٤ وpH=٩/٦ مورد بررسی قرار گرفتند.

٢-٥- شناسایی جدایه‌های لاکتوباسیل بر اساس آنالیز توالی ژنrRNA 16s

٢-٥-١- استخراج DNA

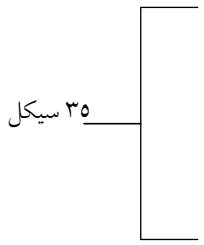
استخراج ژنوم باکتری (Total DNA) از جدایه‌هایی که بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی انتخاب شده بودند صورت گرفت. به منظورایجاد سوسپانسیون میکروبی، هر جدایه در محیط کشت MRS broth به مدت ٢٤ ساعت کشت داده شد، پس از آن رسوب بدست آمده از آخرین سانتریفوژ جهت استخراج DNA توسط کیت شرکت Thermoآمریکا با کد دسترسیK0721استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ١٪و دستگاه نانودراپ اسپکتوفوتومتر (آمریکا، Thermo ND-2000) تعیین گردید.

٢-٥-٢-انجام عملیات PCR و تکثیر ناحیه ژن 16s rRNA پرایمرهای یونیورسال

جهت تکثیر ژن 16s rRNA شامل 27F و 1492R (ماکروژن، کره) به صورت زیر بودند:

Forward: 27F (5′-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3′)
Reverse: 1492R (5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)

واکنش PCR به وسیله مخلوط کردن ١µl از DNA الگو، ٨µl آب دیونیزه استریل، ١µl از مخلوط پرایمرهای 27F و 1492R (غلظت ١٠picomole/ µl)و ١٠µl از Master Mix Red شرکتAmplicon دانمارک در دستگاه ترموسایکلر[2]و برنامه دمایی زیر انجام گرفت[١٤]:



مرحله اول: ٩٥Ċ به مدت ٥ دقیقه (فعال سازی[3])
مرحله دوم: ٩٤Ċبه مدت ٤٥ ثانیه (واسرشته سازی[4])
مرحله سوم: ٥٠Ċ به مدت ٤٥ ثانیه (اتصال[5])
مرحله چهارم: ٧٢Ċ به مدت ٢ دقیقه (توسعه[6])

1. Pour plate

2. Thermocycler
3. Activation
4. Denaturation
5. Annealing
6. Extension

مرحله پنجم: ۷۲Ċ به مدت ۱۰ دقیقه (توسعه نهایی[1])

مرحله ششم: ٤Ċ به مدت ۵ دقیقه

۲-۵-۳- ژل الکتروفورز

برای مشاهده نتایج محصول واکنشPCRپس از بارگذاری واکنش‌های PCRدر ژل آگاروز ۱٪ وزنی- حجمی، الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ ولت و زمان ۳۵ دقیقه صورت گرفت. سپس ژل در دستگاه ژل داک[2]قرار داده و تشکیل باند ۱۵۰۰bpبررسی شد [١٤].

۲-۵-٤- تعیین توالی و مقایسه توالی‌ها

عملیات توالی یابی با استفاده از پرایمرهای 27F و 1492R توسط شرکت Bioneer کره انجام شد. به طور متوسط ۸۵۰bp نوکلئوتید به ازای هر توالی در هر طرف خوانش شد و با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی ژن[3] با کمک برنامه بلاست[4] در سایت http://www.NCBI.nlm.nih.gov مقایسه گردید. جدایه‌هایی با۹۸٪ مشابهت در توالی‌شان به عنوان همان گونه و۹۹٪-۱۰۰٪مشابهت به عنوان همان زیر گونه شناسایی شدند[۱۵؛ ١٦].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی pH و تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک

با توجه به نقش حیاتی اسید لاکتیک تولیدی توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک در کاهش pHپنیر متال و در نتیجه ممانعت کنندگی این اسید در مقابل فساد میکروبی پنیر، بررسی pHدر نمونه‌های پنیر حائز اهمیت می‌باشد. جدول شماره ۱، میزان pH شش نمونه پنیر از شش کارگاه مختلف را نشان می‌دهد.

Table 1 The pH of Motal cheese samples

	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D	Sample E	Sample F
pH	4.31	4.34	4.48	5.09	5.1	3.9

ر تمام نمونه‌های مورد بررسی از پنیر متال، هم جدایه‌های کوکسی و هم باسیل جداسازی شدند، به استثنای نمونه F که تنها سویه‌های *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* سویه‌های غالب آن را تشکیل می‌دادند. قابل ذکر است که pHاین نمونه۳/۹ بوده که پایین ترین pHرا در میان نمونه‌های مورد مطالعه دارا می‌باشد. نتایج حاصل از مطالعه تزانتاکی و تزانتاکیس در سال ۱۹۸۷ روی پنیر سفید حاصل از شیر خام گوسفند، قرابت زیادی با نتایج حاصل از تحقیق پیش رو دارد[۱۷].

بررسی‌های اولیه از قبیل شمارش کلنی‌ها، در یکی از محیط کشت‌های اختصاصی باکتری‌های اسید لاکتیک نظیر MRS agar در دمای۳۷Ċ صورت گرفت. جدول ۲ تعداد باکتری-های اسید لاکتیک مزوفیل هوازی و بی هوازی و همچنین شمارش کلی باکتری‌های مربوط به هر نمونه ذکر شده است. متوسط تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک مزوفیل در شرایط هوازی و بی هوازی به ترتیب حدود ۱۰×۱۰^{٤}cfu g^{-1} و ۷×۱۰^{٤}، علاوه بر این متوسط شمارش کلی باکتری‌ها حدوداً ۱۹×۱۰^{٤}cfu g^{-1}محاسبه گردید.در پژوهشی که مک سوینی[5] و همکاران در سال ۱۹۹۳ انجام دادند مشاهده کردند که تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک غیر آغازگر در طول رسیدن پنیر افزایش می‌یابد و همیشه بین تعداد باکتری‌های آغازگر و باکتری‌های غیر آغازگر ، در طول رسیدن پنیر روند معکوس وجود دارد. در آغاز دوره رسیدگی، تعداد باکتری‌های غازگر بالااست (معمولاً$۱۰^{۸}$-$۱۰^{۹}$cfu g^{-1})، این تعداد عموماً چندسیکل لگاریتمی در دوره رسیدن کاهش می‌یابد، از طرف دیگر میکروارگانیسم‌های غیر آغازگر که ابتدا در پنیر به میزان کمتر وجود دارند در طول رسیدن پنیر افزایش می‌یابند[۱۸، ۱۹]. کرت[6] و همکاران در سال ۲۰۰۳ بیان کردند که باکتری-های اسید لاکتیک غیر آغازگر که ابتدا در تعداد کم وجود دارند، در انواع پنیرهایی که زمان رسیدن طولانی را طی می-کنند به تعداد بالا افزایش می‌یابد[۲۰].دی آنجلیس [7]و همکاران نیز در سال ۲۰۰۱ تنوع بسیار زیادی از باکتری‌های اسید لاکتیک غیر آغازگر را در پنیرهای تجاری حاصل از شیر خام نسبت به پنیرهای تجاری پاستوریزه مشاهده کردند[۲۱].

1. Final Extension
2. Gel doc
3. Gen Bank
4. Blast
5. McSweeney
6. Coeuret
7. De Angelis

Table 2 The colony count of Motal cheese samples (cfu g^{-1})

Total count	Anaerobic LAB	Aerobic LAB	Smple
3×10^5	1×10^5	5×10^4	A
2×10^5	1×10^5	3×10^4	B
6×10^5	2×10^5	5×10^5	C
3×10^3	5×10^3	3×10^3	D
4×10^4	4×10^4	1×10^4	E
5×10^3	2×10^3	3×10^3	F

۳-۲- شناسایی و جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها با روش‌های بیوشیمیایی

جداسازی ایزوله‌های مشکوک به باکتری‌های اسید لاکتیک از نمونه‌های پنیر، پس از بررسی ویژگی‌های ظاهری پرگنه‌ها شامل رنگ، قطر، محل قرارگرفتن (سطحی یا عمقی)، برآمدگی(صاف، محدب و مقعر) و شکل (کروی، بیضوی و چین خورده) در محیط کشت MRS agar در شرایط هوازی و میکروآئروفیلیک و در دمای ۳۷Ċ، مناسب رشد باکتری‌های اسید لاکتیک صورت گرفت. بعد از این مرحله بر اساس ویژگی‌های ظاهری توسط رنگ آمیزی گرم، تعدای از ایزوله-های گرم مثبت، کاتالیز منفی و میله‌ای شکل برای انجام آزمون‌های بیوشیمیایی انتخاب شدند، که از این تعداد ۱۹ ایزوله بعنوان جنس لاکتوباسیلوس انتخاب شدند. جدایه‌های به دست آمده از مرحله قبل، به لحاظ میزان مقاومت به نمک، رشد در دماهای مختلف و pH های متنوع مورد بررسی قرار گرفتند. براساس نتایج به دست آمده در جدول ۳،هیچ یک از جدایه های لاکتوباسیلوس قادربه رشد در دمای٤٥Ċ ، pH=۹/٦ و در حضور۱۸٪ درصد نمک طعام نبودند.

به واسطه اینکه در پنیر متال میزان نمک برای اطمینان از حذف باکتری‌های مضر به۲۰٪می‌رسد، رشد جدایه‌ها در محیط حاوی٦/٥٪نمک طبیعی به نظر می‌رسد. این امر برای اکثر باکتری‌های اسید لاکتیک که دارای خاصیت هالوفیل هستند مخاطره آمیز نبوده و در واقع محیط برای رشد و تکثیر آن‌ها اختصاصی تر می‌شود. این جدایه‌ها همچنین قادر به رشد در pH=٤/٤ بودند.

عبدی و همکاران در سال ۲۰۰٦ جمعیت لاکتیکی غالب جدا شده از پنیر لیقوان را لاکتوباسیلوس‌های مزوفیل گزارش کردند[۲۲]. گرکو[1] و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز طی بررسی بر روی سوسیس ساردینی مشخص کردند که جمعیت غالب آنها طی مراحل رسیدن لاکتوباسیلوس‌های مزوفیل هموفرمنتاتیو و هتروفرمنتاتیو به ترتیب٩٤/٤٪ و٥/٥٪ می-باشد[۲۳].

شناسایی لاکتوباسیلوس‌ها در حد گونه یا سویه بر پایه خصوصیات فیزیولوژیک و معیارهای بیوشیمیایی بسیار پیچیده و گمراه کننده می‌باشد، اگرچه برخی از الگوهامخصوص به گونه می‌باشند. این مسئله ممکن است به دلیل تنوع خصوصیات بیوشیمیایی در یک گونه باشد که در میان لاکتوباسیلوس‌ها به وفور مشاهده شده است. تنوع در پاسخ-های بیوشیمیایی را می‌توان به تخمیر برخی از قندها با واسطه پلاسمید نسبت داد که به صورت نامساوی در میان سویه‌های مختلف پراکنده شده‌اند[٢٤]. تغییرات تاکسونومیک زیادی در جنس لاکتوباسیلوس رخ داده است از جمله توصیف گونه‌های قدیمی به عنوان یک جنس جدید با توصیف گونه‌های جدید، این مسائل موجب می‌شود که شناسایی باکتری‌ها بر پایه تست-های فنوتیپیک مشکل باشد و نیز موجب افزایش استفاده از روش‌های مولکولی بر پایه کشت شده است[۲۰]. اگرچه روش‌های سنتی وابسته به کشت ابزارهای مفید و ضروری می-باشند، اما زمانبر بوده و هم از نظر توانایی افتراق و هم از نظر دقت محدود می‌باشند[۲۵].

1. Greco

Table3 Biochemical characteristics of isolated *Lactobacillus* spp.

Growth at pH 9.6	Growth at pH 4.4	Growth in medium with 18% NaCl	Growth in medium with 6.5% NaCl	Growth at 15 °C	Growth at 45 °C	Isolate number
–	+	–	+	+	–	M1
–	+	–	+	+	–	M13
–	+	–	+	+	–	M17
–	+	–	+	+	–	M19
–	+	–	+	+	–	M54
–	+	–	+	+	–	M58
–	+	–	+	+	–	M66
–	+	–	+	+	–	M67
–	+	–	+	+	–	M70
–	+	–	+	+	–	M76
–	+	–	+	+	–	M97
–	+	–	+	+	–	M99
–	+	–	+	+	–	M100
–	+	–	+	+	–	M101
–	+	–	+	+	–	M102
–	+	–	+	+	–	M120
–	+	–	+	+	–	M125
–	+	–	+	+	–	M128
–	+	–	+	+	–	M144

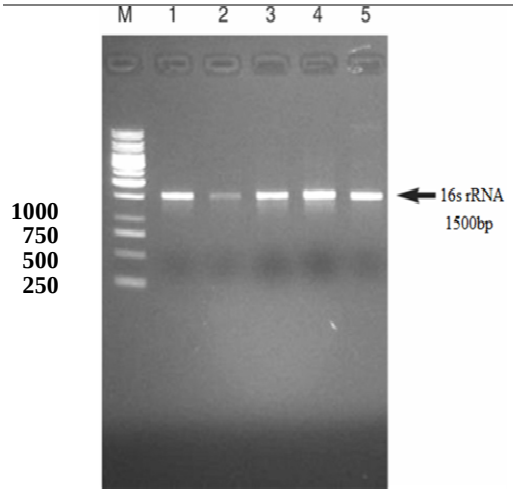


Fig1 PCR product of 16s rRNA (1500 bp) from 5 isolates that are reproduced using universal primers (27F and 1492R). Row M*:* DNA marker 1Kb, rows 1, 2, 3, 4 and 5represent *Lactobacillus brevis* M13, *Lactobacillus buchneri* M125, *Lactobacillus casei* M58, *Lactobacillus plantarum* M19, *Lactobacillus plantarum* M70.

۳-۳- شناسایی جدایه‌ها با استفاده از روش مولکولی

یکی از مهم ترین کاربردهای آنالیز توالی ژن 16s rRNA شناسایی (در حد گونه) جدایه‌هایی است که با هیچ کدام از پروفایل‌های بیوشیمیایی شناخته همخوانی ندارند[۲٦]. پس از استخراج DNA از جدایه‌های موردنظر و تکثیر ژن ناحیه 16s rRNA با استفاده از واکنش PCRو در نهایت تخلیص آمپلیکون‌های به دست آمده، محصول نهایی بر روی ژل آگارز برده شد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود طول‌باندهای به دست آمده بالای ۱۵۰۰bpقرار گرفته که دقیقاً صحت تکثیر ناحیه 16s rRNAرا نشان می‌دهد[۲۱].

نتایج حاصل از تعیین توالی جدایه‌ها نشان داد که جدایه‌های انتخاب شده به چهار گونه *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس بوچنری* تعلق داشتند که در این میان *لاکتوباسیلوس برویس* سویه غالب شناسایی شده در هر ٦ نمونه پنیر می‌باشد.در پژوهشی که کرمانشاهی و همکاران در سال ٢٠١٢ انجام دادند سویه‌های*لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس بوچنری*، *لاکتوباسیلوس کفیری* به ترتیب از پنیر، ماست وعلف تازه با استفاده از روش‌های مولکولی جداسازی و شناسایی شد[٢٧].

Table 4 Identities of pure isolates

Isolate Code	Closest relative	Identity (%)
M1	*Lactobacillus brevis*	%99
M13	*Lactobacillus brevis*	%99
M17	*Lactobacillus brevis*	%100
M19	*Lactobacillus plantarum*	%100
M54	*Lactobacillus brevis*	%99
M58	*Lactobacillus casei*	%100
M66	*Lactobacillus brevis*	%100
M67	*Lactobacillus plantarum*	%99
M70	*Lactobacillus plantarum*	%100
M76	*Lactobacillus brevis*	%99
M97	*Lactobacillus brevis*	%100
M99	*Lactobacillus brevis*	%100
M100	*Lactobacillus brevis*	%99
M101	*Lactobacillus brevis*	%99
M102	*Lactobacillus brevis*	%100
M120	*Lactobacillus brevis*	%100
M125	*Lactobacillus buchneri*	%98
M128	*Lactobacillus brevis*	%100
M144	*Lactobacillus plantarum*	%100

٤- نتیجه گیری

با توجه به تحقیقات گسترده‌ای که بر روی لاکتوباسیلوس‌های مزوفیل جدا شده از پنیرهای سنتی انجام گرفته است، نقش آن-ها در تولید ترکیبات معطر و ویژگی‌های عطری و طعمی این پنیرها مورد تایید است بعنوان مثال در پنیر فُسا (Fossa (pit) Cheese)مشخص گردیده است که باکتری های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس کرواتوس*[1]طی فعالیت‌های دی پپتیداز، آمینو پپتیداز، اندوپپتیداز و پروتئیناز خود سبب تولید پپتیدهای کوچک و اسیدآمینه‌های فرار می‌شوند و عطر و طعم مطلوبی را ایجاد می‌کنند[٢٨].

نتایج حاصل از این بررسی بیانگر وجود پتانسیل بومی و ملی در تهیه باکتری‌های آغازگر جهت تولید پنیر بصورت صنعتی و با ویژگی‌های عطری و طعمی بالا است. علاوه بر این، تحقیقات بیشتری در جهت استفاده از این سویه‌ها به عنوان کشت آغازگر به منظور تولید تجاری پنیر با کیفیت و جنبه‌های بهداشتی بهبود یافته، مورد نیاز می‌باشد. به طور کلی حضور این سویه‌ها گواه این مطب است که این سویه‌ها با محیط این پنیر و همچنین شرایط نامناسب موجود در پنیر رسیده سازگار می‌باشند. درنتیجه این میکروارگانیسم‌ها را می‌توان به عنوان کشت آغازگر، در تولید پنیرهای صنعتی واجد خصوصیات منحصر به فرد پنیرهای سنتی استفاده کرد. مطالعات تکمیلی در مورد خصوصیات بالقوه تکنولوژیکی و پروبیوتیکی جدایه ها انجام گرفته است که پس از تجزیه و تحلیل نتایج بدست آمده، در آینده منتشر خواهد شد.

٥- منابع

[1] Fox PF. 1993. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. London: Chapman and Hall.Number of 1–10 pp

[2] Grappin R, Beuvier E. 1997. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7:751-61.

1. *Lactobacillus curvatus*

[3] Wouters JT, Ayad EH, HugenholtzJ, Smit G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12:91-109.

[4] Díaz - Muñiz I, Banavara D, Budinich M, Rankin S, Dudley E, Steele J. 2006. Lactobacillus casei metabolic potential to utilize citrate as an energy source in ripening cheese: a bioinformatics approach. Journal of Applied Microbiology, 101:872-82.

[5]. Gaya P, Sánchez C, Nuñez M, Fernández-García E. 2005. Proteolysis during ripening of Manchego cheese made from raw or pasteurized ewes' milk. Seasonal variation. Journal of Dairy Research, 72:287-95.

[6] Hickey D, Kilcawley K, Beresford T, Wilkinson M. 2007. Lipolysis in cheddar cheese made from raw, thermized, and pasteurized milks. *Journal of Dairy Science*, 90:47-56.

[7] Navidghasemizad S, Hesari J, Saris P, Nahaei MR. 2009. Isolation of lactic acid bacteria from Lighvan cheese, a semihard cheese made from raw sheep milk in Iran. *International Journal of Dairy technology*, 62:260-4.

[8]. Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71:394-406.

[9]. Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3:777-88.

[10] Goktepe I. 2006. Probiotics as biopreservatives for enhancing food safety. *Probiotics in Food Safety and Human Health*, 285-307.

[11] Kandler O, Weiss N. 1986. Genus Lactobacillus. In Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology*. ed. PHA Sneath, NS Mair, ME Sharp, JG Holt. Baltimore: Williams and Wilkins. Number of 1209–34 pp.

[12] Edalatian M.R. 2011. Identification and characterization of lactic flora of Iranian raw milk cheeses using cultural and molecular methods. Thesis. Ferdowsi university of Mashhad.

[13] Swanson KMJ, Petran RL, Hanlin JH. 2001. Culture methods for enumeration of microorganisms. In *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, ed. FP Downes, K Ito. washington, DC: American Public Health Association. Number of 53-62 pp.

[14] Alegría Á, Álvarez-Martín P, Sacristán N, Fernández E, Delgado S, Mayo B. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. International Journal of Food Microbiology, 136:44-51.

[15]. Palys T, Nakamura L, Cohan FM. 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. .International Journal of Systematic andEvolutionary Microbiology, 47:1145-56.

[16] Stackebrandt E, Goebel B. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 44:846-9.

[17] Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E, Manolkidis K. 1987. Microbiology of Kopanisti, a traditional Greek cheese. Food Microbiology, 4:251-6.

[18] Beuvier E, Berthaud K, Cegarra S, Dasen A, Pochet S, Buchin S, Duboz G. 1997. Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized ormicrofiltered milk. *International Dairy Journal*, 7:311-23.

[19] McSweeney P, Fox P, LuceyJ, Jordan K, Cogan T. 1993. Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 3:613-34.

[20] Coeuret V, Dubernet S, Bernardeau M, Gueguen M, Vernoux JP. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Le Lait*, 83:269-306.

[21] De Angelis M, Corsetti A, Tosti N, Rossi J, Corbo M, Gobbetti M. 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:2011-20.

[22] Abdi R, Sheikh-Zeinoddin M, Soleimanian-Zad S. 2006. Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Iranian Lighvan Cheese. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9:99-103.

[23] Greco M, Mazzette R, De Santis EPL, Corona A, Cosseddu A. 2005. Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. *Meat Science*, 69:733-9.

[24] Lopez S, Mayo B. 1997. Identification and characterization of homofermentative mesophilic Lactobacillusstrains isolated from artisan starter‐free cheeses. Letters in Applied Microbiology, 25:233-8.

[25] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59:143-69.

[26] Janda JM, Abbott SL. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45:2761-4.

[27] Kermanshahi RK, Peymanfar S. 2012. Isolation and identification of lactobacilli from cheese, yoghurt and silage by 16S rDNA gene and study of bacteriocin and biosurfactant production. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 5:528-32.

[28] Beukes EM, Bester BH, Mostert JF. 2001. The microbiology of South African traditional fermented milks. *International Journal of Food Microbiology*, 63:189-97.

Identification of lactobacillus bacteria isolated from traditional raw milk Motal cheese using polyphasic approach

Azizi, F. [1], Habibi Najafi, M. B. [2*], Edalatian, M. R. [3]

1. M.Sc of Food Microbiology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 2016/05/29 Accepted: 2016/08/21)

Lactic acid bacteria, a group of non-spore forming gram-positive microorganisms, in the form of cocci or bacilli which produce lactic acid as a major product of the carbohydrate fermentation. These bacteria produce several compounds such as bacteriocins that exhibit anti bacterial activity against pathogenic and spoilage bacteria which lead to increase the safety and shelf life of food. Lactic acid bacteria especially species of the genus Lactobacillus are an indispensable part of intestinal microbiota in human and animals and were found in most probiotic products. The aim of this study was to isolate and identify the lactobacillus strains from microbiota of six samples of traditional Motal cheese. In order to achieve this objective, out of 180 strains of lactic acid bacteria from Motal cheese, 19 isolates using biochemical confirmed tests were selected as the genus of Lactobacillus, using PCR amplification of 16s rRNA gene sequences methods. Finally,*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* and *lactobacillus buchneri* were found to be 13, 4, 1 and 1 isolates respectively. Determination the potential technological and probiotic characteristics of all isolates in order to introduce their appropriate application are underway.

Keywords: Lactobacillus, Motal cheese, 16s rRNA

* Corresponding Author E-Mail Address: habibi@um.ac.ir