

جداسازی و شناسایی لاکتوباسیل‌های شیر خام شتر تک کوهانه ایرانی (*Camelus dromedarius*) و بررسی خواص تکنولوژیکی آنها

نفیسه دعوتی^۱، فریده طباطبائی یزدی^۲، سعید زیبائی^{۳*}، فخری شهیدی^۴،

محمد رضا عدالتیان^۵

۱- دانشجوی دکترای میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی واحد شمال شرق

۴- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

۵- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۲۸)

چکیده

مطالعات نشان داده‌اند که شیر شتر و محصولات تخمیری آن خواص درمانی و ارزش تغذیه‌ای بالایی دارند. باکتری‌های اسید لاکتیک نقش مهمی در محصولات تخمیری لبنی بازی می‌کنند. هدف از این مطالعه تعیین اجتماع لاکتوباسیل‌های شیر شتر است. ۹ لاکتوباسیل از شیر شتر تک کوهانه استان گلستان جداسازی گردید. لگاریتم تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی لاکتوباسیل‌ها روی محیط MRS تحت شرایط بی‌هوازی در دماهای ۲۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد به ترتیب به ترتیب $8.3 \times 10^7 \pm 0.78 \times 10^8$ و $7.3 \times 10^7 \pm 0.03$ بود. بر اساس خواص بیوشیمیایی و فنوتیپی باکتری‌های لاکتوباسیلوس پاراپلاتاروم، لاکتوباسیلوس فریتوشنسز، لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس پانتیریس، لاکتوباسیلوس جونسونی و لاکتوباسیلوس مالی در این شیر شناسایی شدند. حضور اسیدلاکتیک باکتری‌ها توسط تشکیل باندها محصول PCR در ۱۵۰۰bp تایید شد (تکثیر ژن 16S rRNA با پرایمرهای یونیورسال B27F و U1492R). بررسی خواص تکنولوژیکی جدایه‌ها نشان داد که لاکتوباسیل‌های جدا شده دارای فعالیت لیپولیتیک و پروتئولیتیک بوده و قابلیت بالایی در تولید اسید (به غیر از لاکتوباسیلوس مالی و لاکتوباسیلوس جونسونی) دارند. همچنین این جدایه‌ها به غیر لاکتوباسیلوس جونسونی قابلیت اتولیزاسیون در سطح نسبتاً خوب دارند. بر اساس بررسی خواص تکنولوژیکی جدایه‌های لاکتوباسیلوس پاراپلاتاروم، لاکتوباسیلوس برویس و لاکتوباسیلوس پانتیریس کاندیداهای مناسبی برای فراوری شیر شتر و سایر محصولات لبنی دیگر پیشنهاد می‌شوند.

کلید واژگان: شتر، شیر، لاکتوباسیل‌ها، لیپولیتیک، پروتئولیتیک.

* مسئول مکاتبات: s.zibae@mrzi.ac.ir

۱- مقدمه

تخمیری نظیر پنیر و جلوگیری از رشد باکتری‌های خارجی و کوآگولاسیون سریع از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد [۳]. در جهت صنعتی شدن تولید این فراورده قبل از هر چیز باید در زمینه تعیین ارزش تغذیه‌ای و ویژگی‌های میکروبی این محصول بومی کشور اطلاعاتی کسب کرد. با توجه به اهمیت فلور میکروبی هر محصول تخمیری در ایجاد طعم، عطر، اسیدیته، بافت، خواص حسی، خواص ضد باکتریایی، خواص درمانی، خواص پروبیوتیکی و سایر ویژگی‌های یک محصول تخمیری لبنی باید ابتدا فلور میکروبی ماده خام اولیه بومی آن منطقه مطالعه شود. مطالعات متعددی عمدتاً در چین، مراکش، سودان، عربستان و الجزایر بر روی جداسازی و شناسایی فلور لاکتیکی شیر خام شتر و فراورده‌های تخمیری حاصل از آن انجام شده است. بر اساس این مطالعات نشان داده شد که باکتری‌های لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس^۲، لاکتوباسیلوس هلوتیکوس^۳، استرپتوکوکوس سالیاریوس زیرگونه ترموفیلوس^۴، لاکتوباسیلوس کازئی زیرگونه کازئی^۵، لاکتوباسیلوس پلانتروم [۴]، لاکتوباسیلوس پلانتروم^۶، لاکتوکوکوس رافینولاکتیس^۷، لاکتوباسیلوس انیمالیز^۸، لاکتوباسیلوس برویس^۹، لاکتوباسیلوس دایورژنز^{۱۰}، لاکتوباسیلوس رامانوسوز^{۱۱}، لاکتوباسیلوس گاسری^{۱۲}، لاکتوباسیلوس پاراکازئی^{۱۳}، لاکتوباسیلوس فرمتوم^{۱۴}، لاکتوکوکوس الیمنتاریوم^{۱۵} [۵]، انتروکوکوس فکالیس^{۱۶}، انتروکوکوس فسیوم^{۱۷} و انتروکوکوس دورانس^{۱۸} [۶] تا کنون از شیر شتر جداسازی شده‌اند. بر اساس مطالعات انجام شده در دنیا در بررسی برخی خواص تکنولوژیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از شیر شتر، جدایه‌های لاکتوکوکوسی،

با پدیده گرم شدن زمین و در پی داشتن خشکسالی‌های پیش بینی شده در آینده استفاده از دام‌های مقاوم به شرایط آب و هوایی گرم و کم آبی نظیر شتر به عنوان یکی از منابع تامین کننده نیاز غذایی انسان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از طرفی با افزایش رشد جمعیت و کاهش تولید سرانه شیر لزوم توجه به منابع پروتئینی جایگزین شیر گاو اهمیت پیدا می‌کند. با توجه به موقعیت جغرافیایی ایران و مستعد بودن آن جهت پرورش حیوانات اهلی دیگر غیر از گاو نظیر شتر، تولید شیر از این حیوان قابل توجه و بررسی می‌باشد. شیر شتر از نظر ارزش غذایی، خواص درمانی و توان عملکردی دارای ویژگی‌های منحصر به فردی است که بر ارزش تحقیقات انجام شده در ارتباط با آن می‌افزاید. شیر شتر به دلیل حضور اسیدهای آمینه باند شده غیر پروتئینی^۱ به سهولت توسط میکروارگانیسم‌ها هضم می‌گردد و بنابراین هنگامی که در تهیه کشت آغازگر و یا سایر فراورده‌های تخمیری استفاده می‌شود، فعالیت متابولیکی بیشتری را برای باکتری‌ها حاصل خواهد کرد. فلور میکروبی غالب شیر شتر باکتری‌های اسیدلاکتیک معرفی شده‌اند که می‌توان در تکنولوژی فراورده‌های لبنی از آن بهره برد. این فلور میکروبی ممکن است دارای فعالیت ضدتوموری، کاهش کلسترول سرم، کاهش و درمان نقص عدم تحمل لاکتوز، تحریک سیستم ایمنی و تثبیت فلور میکروبی دستگاه گوارش باشند [۱]. در بررسی پتانسیل عملکردی باکتری‌های اسید لاکتیک در تولید فراورده‌های تخمیری، می‌توان به فعالیت‌های پروتئولیتیکی، لیپولیتیکی، اتولیتیکی و قابلیت اسیدی کردن آن‌ها اشاره کرد. فعالیت پروتئولیتیکی از نظر تجزیه پروتئین‌ها و پپتیدها به اسیدهای آمینه آزاد به عنوان پیش ساز مواد مولد طعم و آروما حائز اهمیت است. فعالیت لیپولیتیکی هم در تولید آروما و طعم موثر می‌باشند، فعالیت اتولیتیکی از نظر رها شدن آنزیم‌های درون سلولی نظیر پروتازها و لیپازها که در رسیدگی پنیر و تولید عطر و طعم موثر می‌باشند اهمیت پیدا می‌کند [۲]. ایجاد اسیدیته بالا و کاهش سریع pH در اوایل دوره رسیدگی فراورده‌های

2. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
3. *Lactobacillus helveticus*
4. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*
5. *Lactobacillus casei* subsp. *casei*
6. *Lactobacillus plantarum*
7. *Lactococcus raffinolactis*
8. *Lactobacillus animalis*
9. *Lactobacillus brevis*
10. *Lactobacillus divergens*
11. *Lactobacillus rhamnosus*
12. *Lactobacillus gasserii*
13. *Lactobacillus paracasei*
14. *Lactobacillus fermentum*
15. *Lactococcus alimentarium*
16. *Enterococcus faecalis*
17. *Enterococcus faecium*
18. *Enterococcus durans*

1. Nonprotein-bound amino acids

بررسی قرار گرفتند. جدایه‌هایی باسیلی که از نظر تست کاتالاز، منفی و رنگ آمیزی گرم، مثبت ارزیابی شدند جهت شناسایی تا سطح جنس لاکتوباسیل به لحاظ قابلیت یا عدم قابلیت رشد در دو غلظت ۶/۵ و ۱۸ درصد کلرید سدیم (مرک، آلمان)، دو دمای °C ۱۵ و °C ۴۵، pH های ۴/۴ و ۹/۶ و تولید گاز CO₂ از گلوکز مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این آزمایشات از محیط پایه MRS براث (مرک، آلمان) استفاده گردید و نمک در دو غلظت ۶/۵ و ۱۸ درصد کلرید سدیم اضافه و سپس اتوکلاو (ریحان طب، ایران) گردید. جهت تنظیم pH پس از آنکه محیط پایه اتوکلاو شد تحت شرایط استریل اسید استیک ضعیف (مرک، آلمان) و سود ۰,۰۵، نرمال (مرک، آلمان) با فیلتر سرسورنگی با مش ۰,۲۲µm (جت بیوفیل، چین) اضافه گردید و pH با pH متر تنظیم شد (لبرون، ایران) [۸].

۲-۲- شناسایی جدایه‌ها تا سطح گونه

جدایه‌های تایید شده در جنس لاکتوباسیل از مرحله قبل، براساس پروفایل تخمیر کربوهیدرات‌ها شامل لاکتوز (سیگما، آمریکا)، آمیگدالین، آرابینوز، سلوبیوز، گالاکتوز، گلوکونات، مالتوز، مانیتول، دی-مانوز، ملیبیوز، رافینوز، سالیسین، سوربیتول، ساکروز، تری‌هالوز، گزیلوز، ملی‌زیتوز، ریبوز، اسکولین (مرک، آلمان) و تولید NH₃ از آرژنین (مرک، آلمان) تا سطح گونه مورد شناسایی قرار گرفتند. تخمیر کربوهیدرات‌ها در MRS براث بدون قند حاوی ۱٪ محلول کربوهیدرات و ۰,۰۲۵٪ بروموکروزل ارغوانی (مرک، آلمان) به عنوان شاخص pH انجام شد. نتایج بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در °C ۳۰ ثبت شد. برای تامین شرایط بی‌هوازی ۱ میلی لیتر پارافین مایع استریل بر سطح محیط قندی اضافه گردید. نتایج آزمون جدایه‌ها با خصوصیات بیوشیمیایی لاکتوباسیل‌ها در کتاب راهنمای برگیس مطابقت داده شد [۹]. یک نماینده از هر گروه باکتری که بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی طبقه بندی شدند جهت بررسی خواص تکنولوژیکی انتخاب شد.

۲-۳- شناسایی مولکولی لاکتوباسیل‌های

جداسازی شده از شیر شتر

جهت استخراج DNA، کلنی خالص از هر جدایه در ۵۰ میکرولیتر آب استریل دوبار تقطیر تعلیق سازی شد و سپس ۵۰

اتروکوکوسی و لاکتوباسیلی از شیر شتر، فعالیت پروتئولیتیکی خوبی نشان دادند و لاکتوباسیل‌ها از فعالیت پروتئولیتیکی و اتولیتیکی بیشتری نسبت به بقیه برخوردار بودند. سویه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس از لحاظ فعالیت اسیدیفیکاسیون نسبت به بقیه سریع‌تر عمل کردند و لاکتوباسیلوس رامنوز، لاکتوباسیلوس پلانناروم، اتروکوکوس دورانس و اتروکوکوس فسیوم فعالیت اتولیتیکی خوبی نشان دادند [۷]. هدف از مطالعه ما نیز جداسازی و شناسایی لاکتوباسیل‌ها به عنوان یکی از جنس‌های مهم خانواده بزرگ اسید لاکتیک باکتری‌های شیر حاصل از شترهای بومی استان گلستان (ناحیه گنبد) بر اساس تست‌های بیوشیمیایی، تایید نتایج شناسایی توسط آزمون‌های مولکولی و سپس ارزیابی قابلیت پروتئولیتیکی، لیپولیتیکی، اتولیتیکی و تولید اسید توسط ایزوله‌ها جهت انجام فرایندهای تخمیری می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌گیری و جداسازی لاکتوباسیل‌ها

در ماه اسفند نمونه برداری انجام شد. ابتدا محل نمونه برداری (پستان شتر) با الکل ۷۰٪ ضدعفونی شد. سپس ۶ نمونه شیر از شترهای تک کوهانه منطقه گنبد استان گلستان تحت شرایط استریل جمع‌آوری شد و بلافاصله در دمای °C ۴ به آزمایشگاه محل تحقیق انتقال داده شدند. سپس بر روی محیط MRS (مرک، آلمان) از رقت‌های سریالی تهیه شده از نمونه (۱۰^{-۳} تا ۱۰^{-۷}) در پیتون واتر (مرک، آلمان)، کشت سطحی انجام گردید و تحت شرایط بی‌هوازی (جار بی‌هوازی و گاز پک نوع A (مرک، آلمان)) در دمای °C ۲۰، ۳۷ و ۴۵ به مدت ۴۸ ساعت در ۳ تکرار گرمخانه‌گذاری (ویژین، کره) گردید. کلنی‌های حاصل شده بر روی محیط MRS شمرده شده، آن‌هایی که از نظر شکل ظاهری و تحذب با هم اختلاف داشتند به طور تصادفی انتخاب شده و به وسیله کشت خطی خالص‌سازی گردیدند. میانگین شمارش جدایه‌ها در هر دما در ۳ تکرار با احتساب انحراف معیار محاسبه گردید. کلنی‌های خالص‌سازی شده از نظر مشاهده میکروسکوپی (الیمپوس Dp12، آمریکا) با بزرگنمایی ۱۰۰، آزمون کاتالاز و رنگ آمیزی گرم مورد

۱۰٪ تلقیح شد و ۲۴ ساعت در 37°C گرمخانه‌گذاری (ویژین، کره) گردید. فعالیت لیپولیتیکی توسط ظهور رسوب قابل رویت کریستال‌های نمک کلسیم حاصل از اسید چرب آزاد شده توسط فعالیت لیپازی یا به صورت ایجاد ناحیه شفاف رسوب اطراف کلنی به واسطه تجزیه کامل نمک اسید چرب بررسی شد [۱۲].

۲-۶- ارزیابی کمی فعالیت لیپولیتیکی

جدایه‌های لاکتوباسیلی در MRS براث (مرک، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در 37°C (ویژین، کره) کشت گردیدند. کشت حاصل در 8000 g به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفریژ (اپندورف، آلمان) گردید. محلول رویی برای ارزیابی کمی فعالیت لیپولیتیکی انتخاب گردید [۱۳ و ۱۴]. فعالیت آنزیم لیپاز طبق روش یامادا و همکارانش^۱ به صورت زیر در ۳ تکرار اندازه‌گیری شد: ۱ میلی لیتر محلول آنزیمی به ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۰٫۲ مولار با $\text{pH}=7$ و ۱ میلی لیتر محلول کلرید کلسیم ۰٫۱ مولار (مرک، آلمان) اضافه گردید. سپس ۵ میلی لیتر از امولسیون سوبسترا (روغن زیتون و پلی‌وینیل الکل با نسبت حجمی ۳/۱) به آن اضافه شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، برای خاتمه واکنش ۲۰ میلی لیتر مخلوط هم حجم استن-اتانول (مرک، آلمان) به آن اضافه گردید تا امولسیون شکسته گردد. سپس ۳ قطره فنل فتالین ۱٪ به آن افزوده و با سود 0.05 N نرمال تیترا گردید. حجم سود مصرفی جهت تیترا را V_1 فرض می‌کنیم. برای محلول شاهد، کلیه مراحل فوق به غیر از افزودن محلول آنزیمی انجام شد. حجم سود مصرفی در تیتراسیون شاهد را V_2 فرض کردیم. واحد فعالیت لیپاز (LU)، مقدار فعالیت آنزیمی است که یک میکرومول اسید چرب را در مدت ۱ دقیقه در شرایط دمای 37°C و بافر فسفات با $\text{pH}=7$ ، از سوبسترا آزاد نماید. طبق فرمول زیر فعالیت آنزیم در هر میلی لیتر محاسبه گردید [۱۱]. فعالیت لیپاز $U = [\text{Unit/ml}]$ ؛ نرمالیتیه سود مصرفی N ؛ حجم سود مصرفی V ؛ مدت زمان t .

$$U = \frac{N \times (V_1 - V_2) \times 1000}{t}$$

1. Yamada et al

میکرولیتر از الکل ایزوآمیل/کلروفرم (۲۴/۱) (مرک، آلمان) اضافه گردید و بعد از ورتکس کردن، مخلوط در 16000 g به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتیفریژ (اپندورف، آلمان) شد. سپس DNA الگو از فاز آبی برای واکنش PCR استفاده گردید [۱۰]. پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن (5'-16S rRNA و AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') U1492R و (5'-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3') (بایونیر، کره جنوبی) بودند [۷]. واکنش PCR به وسیله مخلوط کردن $5\text{ }\mu\text{l}$ از DNA استخراج شده با $25\text{ }\mu\text{l}$ از 2X PCR Master (سیناکلون، ایران)، $1\text{ }\mu\text{l}$ از هریک از پرایمرهای B27F و U1492R با غلظت $10\text{ picomole}/\mu\text{l}$ و $18\text{ }\mu\text{l}$ آب دیونایز توسط ترموسایکلر (اسکو، سنگاپور) با شرایط زیر انجام گردید: دناتوراسیون اولیه: 94°C به مدت ۵ دقیقه، سپس 40 سیکل در 94°C (۱ دقیقه)، 56°C (۱ دقیقه) و 72°C (۱ دقیقه). پس از توسعه نهایی در 72°C (۱۰ دقیقه)، تیوب‌ها در 4°C سرد شدند [۱۱]. در نهایت آمپلیکون حاصل جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره فرستاده شد و نتایج آن با داده‌های گزارش شده در سایت www.ncbi.nlm.nih.gov مقایسه گردید.

۲-۴- ارزیابی کیفی فعالیت پروتولیتیکی

فعالیت پروتولیتیکی جدایه‌ها به وسیله کشت بر روی پلیت کانت آگار (مرک، آلمان) حاوی ۲٪ پودر شیر پس چرخ (مرک، آلمان) و بررسی هاله حاصل از پروتولیز ایجاد شده توسط آن‌ها ارزیابی شد. هر جدایه با ایجاد هاله اطراف کلنی به عنوان باکتری با فعالیت مثبت پروتولیتیکی ثبت شد [۱۲].

۲-۵- ارزیابی کیفی فعالیت لیپولیتیکی

محیط کشتی بر حسب گرم در لیتر شامل پپتون ۱۰، کلرید کلسیم ۰٫۱، کلرید سدیم ۵ و آگار ۲۰ (مرک، آلمان) جهت بررسی فعالیت لیپولیتیکی استفاده گردید. سپس محیط با آب مقطر به حجم رسانده و به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو (ریحان طب، ایران) گردید. ۱۰ میلی لیتر توئین ۲۰ (سیگما، آمریکا) استریل شده به آن اضافه شد و تحت شرایط استریل pH آن تا ۶ تنظیم گردید. این محیط توسط کشت تازه هر جدایه به میزان

جدول ۱ لگاریتم تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی لاکتوباسیل

در میلی لیتر	دمای گرمخانه گذاری	محیط کشت	Log CFU/mL
	(°C)		
MRS	۲۰		۸,۷۹۲±۰,۱۴
MRS	۳۷		۸,۳۰۱±۰,۰۷
MRS	۴۵		۷,۳۰۱±۰,۰۳

بر اساس مطابقت با راهنمای برگیس، آزمون‌های بیوشیمیایی و فنوتیپیکی نشان دادند که این ۹ باکتری مربوط به ۶ گونه لاکتوباسیلی می‌باشند (جدول ۲). بر اساس این مطالعه و مطالعاتی که سایر محققین در شناسایی فلور لاکتیکی شیر شتر یا محصولات آن انجام دادند تنوع زیادی به چشم می‌خورد. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که محققین بر روی جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک شیر خام شتر از ۳ نژاد ناچر، تارگوی و رگویی^۲ گله‌های صحرائی در جنوب الجزایر انجام دادند لاکتوباسیلوس پلانٹاروم^۳، لاکتوباسیلوس پاراکازئی^۴ و لاکتوباسیلوس رامنوسوز^۵ جداسازی شدند [۱۸]. همچنین حضور لاکتوباسیلوس برویس^۶، لاکتوباسیلوس ساکی^۷ و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس^۸ در جداسازی اسید لاکتیک باکتری‌های موجود در شاپوت (یک محصول تخمیری از شیر شتر در چین و مغولستان) نشان داده شد [۲۲]. این اختلاف گونه‌ای می‌تواند وابسته به نژاد شتر، آب و هوا، ترکیبات شیمیایی شیر و نوع تغذیه شترها در نقاط مختلف دنیا باشد. شکل ۱ ایجاد باند معادل ۱۵۰۰bp (با مقایسه با مارکر ۱۰۰۰bp) از تکثیر ژن 16S rDNA لاکتوباسیل‌های جدا شده از شیر شتر را نشان می‌دهد. تکثیر ژن 16S rDNA باکتری‌های اسید لاکتیک باید محصول ۱۵۰۰bp حاصل کند. توانایی سویه‌ها به لیز شدن و آزاد کردن آنزیم‌های درون سلولی در طی رسیدگی پنیر، ویژگی مطلوبی در صنعت محسوب می‌شود [۲۰].

سپس میانگین فعالیت لیپاز هر جدایه در ۳ تکرار با احتساب انحراف معیار محاسبه گردید.

۲-۷- ارزیابی قابلیت تولید اسید

سویه‌ها به طور اولیه در MRS برات (مرک، آلمان) فعال‌سازی شده و سپس به میزان ۱٪ در شیر پس چرخ بازسازی شده به همراه عصاره مخمر ۰,۲٪ (مرک، آلمان) و گلوکز ۰,۱٪ (مرک، آلمان) کشت داده شدند و سپس در طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری (ویژین، کره) در ۳۰ درجه سانتی‌گراد pH (لبترون، ایران) آن اندازه‌گیری گردید [۱۳].

۲-۸- ارزیابی قابلیت اتولیتیکی

رسوب سلولی از کشت شبانه در بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی-مولار با pH=۵,۵ حاوی امولار کلرید سدیم تعلیق سازی و تا OD₆₂₀ معادل ۱ رقیق سازی گردید. سوسپانسیون سلولی در معرض یک سیکل انجماد (۲۰- درجه سانتی‌گراد، ۲۴ ساعت) و خروج از انجماد قرار گرفته سپس در ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری (ویژین، کره) شدند. میزان فعالیت اتولیتیکی توسط اندازه‌گیری کاهش درصد جذب در ۶۲۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS (شیمادزو، ژاپن) و بر اساس فرمول زیر بررسی شد (۱۶ و ۱۷). شدت اتولیز به صورت زیر محاسبه گردید:

$$\text{جذب اولیه} = A_0 \quad \text{جذب} = A_t \quad (A_0 - A_t) \times 100 / A_0$$

اندازه‌گیری شده بعد از t زمان گرمخانه‌گذاری شده براساس این فرمول، لاکتوباسیل‌ها از نظر اتولیز شدن براساس معیار تشریح شده توسط آیاد و همکارانش^۱ به این صورت درجه‌بندی می‌شوند: خوب=۷۰-۹۶، نسبتاً خوب=۴۰-۶۹ و ضعیف=۰-۳۹ [۱۸].

۳- نتایج و بحث

جدول ۱ نشان می‌دهد که بیشترین تعداد تشکیل دهنده کلنی در دمای ۲۰ °C حاصل شده است. ۹ لاکتوباسیل به وسیله کشت بر روی محیط MRS از شیر شتر جداسازی گردید.

2. N'ajjer, Targui and Reguibi
3. *Lactobacillus plantarum*
4. *Lactobacillus paracasei*
5. *Lactobacillus rhamnosus*
6. *brevis Lactobacillus*
7. *Lactobacillus sakei*
8. *Lactobacillus helveticus*

1 Ayad et al

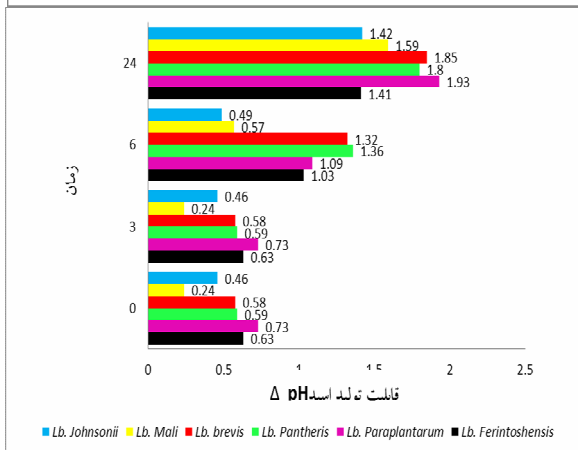
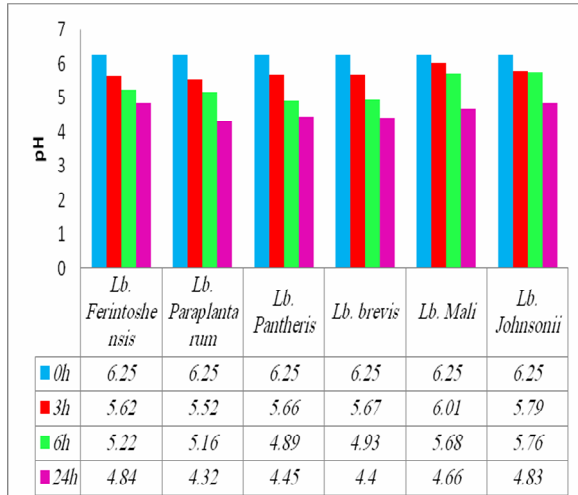
جدول ۲ مشخصات فنوتیپیکی لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از شیر شتر

گروه C (هتروفرمنتاتیو اجباری)		گروه B (هتروفرمنتاتیو اختیاری)		گروه A (هوموفرمنتاتیو اجباری)		باکتری
<i>L. brevis</i>	<i>L. ferintoshensis</i>	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. mali</i>	<i>L. pantheris</i>	شناسایی شده
۱	۲	۳،۴،۵	۶	۷	۸،۹	شماره جدایه
						رشد در:
+/-	+/-	+/-	+/+	+/+	+/-	۱۵/ ۴۵ (°C)
+	+	+	+	+	-	۶،۵٪ کلرید سدیم
-	-	-	-	-	-	۱،۸٪ کلرید سدیم
-	-	-	+	+	+	pH=۴،۴
-	-	-	-	-	-	pH=۹،۶
+	+	-	-	-	-	تولید CO ₂ از گلوکز
						تولید اسید از:
		+	+	+	-	Amygdalin
-	+	+	+	+	+	Cellobiose
+	+		+	+	+	Galactose
			+	+	+	Lactose
+	+		+	+	+	Maltose
		+	-	-	-	Mannitol
-	+		+	+	+	Mannose
+	+	+	+	+	-	Melibiose
+	+	+	+	+	-	Raffinose
			+	+	+	Salicin
+	+	+	+	+	-	Sucrose
-	+		+	+	+	Trehalose
+	+	+				Arabinose
+	+	+				Esculin
		+				Gluconate
-	+	+				Melezitose
+	+	+				Ribose
		+				Sorbitol
+	+	-				Xylose
+	+					تولید NH ₃ از آرژنین

باشد. کشت‌هایی با شدت بالای اتولیزاسیون در تولید پنیر به دلیل رهایش سریع‌تر آنزیم‌های لیپولیتیکی و پروتئولیتیکی که در تشکیل طعم محصولات تخمیری لبنی می‌تواند موثر باشد از اهمیت بالایی برخوردار هستند.

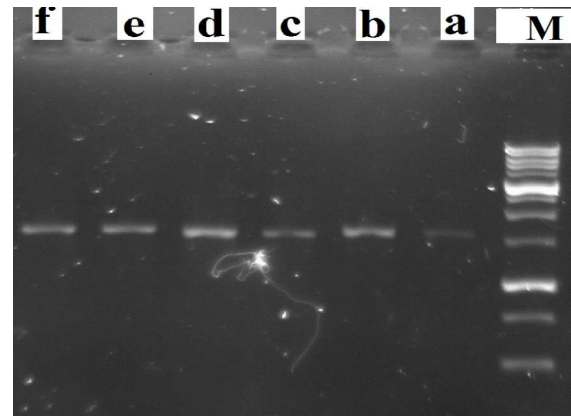
شکل ۲ نشان می‌دهد تمام لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از شیر شتر به غیر از لاکتوباسیلوس جونسونی بر اساس معیار طبقه‌بندی، قابلیت اتولیز شدن در حد نسبتاً خوب را دارند و لاکتوباسیلوس پانتیریس دارای بیشترین امتیاز اتولیز شدن می

اند بایستی باکتری‌های اسید لاکتیک مناسب استارتر بعد از گذشت ۶ ساعت از کشت pH معادل 5 ± 0.2 حاصل کنند و یک باکتری تولید کننده سریع اسید باید به مدت ۳ ساعت اختلاف pH معادل واحد 0.4 حاصل کند.

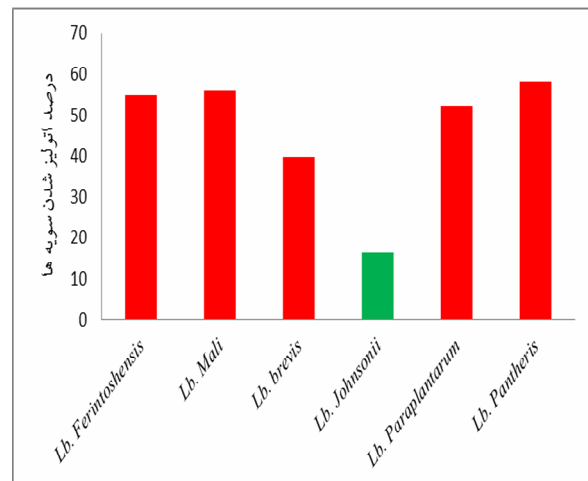


شکل ۳ نمودار میله‌ای تغییرات pH لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از شیر شتر در طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری

چنین باکتری به عنوان استارتر جهت تخمیر اولیه پیشنهاد می‌شود و تولید کننده ضعیف اسید به عنوان کمکی بسته به خواص مورد انتظار از تخمیر استفاده می‌شود [۱۷]. باتوجه به شکل ۳ همگی لاکتوباسیل‌های جدا شده از شیر شتر به غیر از لاکتوباسیلوس مالی قادر به ایجاد $\Delta pH = 0.4$ واحد بعد از ۳ ساعت می‌باشند همچنین نشان داده شد همه جدایه‌ها غیر از لاکتوباسیلوس مالی و لاکتوباسیلوس جونسونی بعد از گذشت ۶ ساعت از کشت قادر به ایجاد pH معادل 5 ± 0.2 می‌باشند که به عنوان استارتر قوی در صنعت می‌توانند پیشنهاد شوند. براساس نتایج لاکتوباسیلوس برویس و لاکتوباسیلوس پانتریس شیب تغییرات pH بالایی در ۶ ساعت اولیه کشت

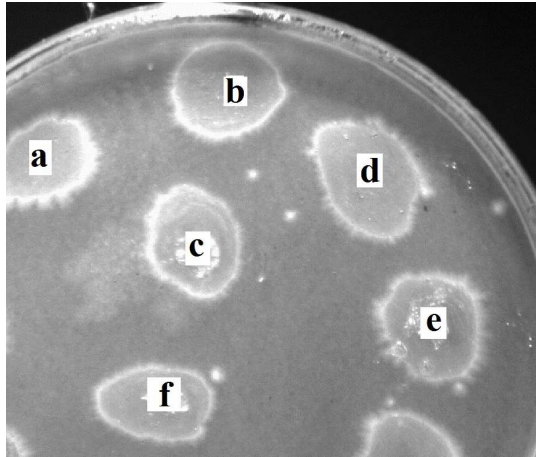


شکل ۱ نتایج تکثیر ژن 16S rRNA با پرایمرهای یونیورسال B27F و U1492R لاکتوباسیل‌های جدا شده از شیر شتر *Lb. brevis* (a), *Lb. ferintoshensis* (b), *Lb. paraplantarum* (c), *Lb. johnsonii* (d), *Lb. mali* (e), *Lb. pantheris* (f)



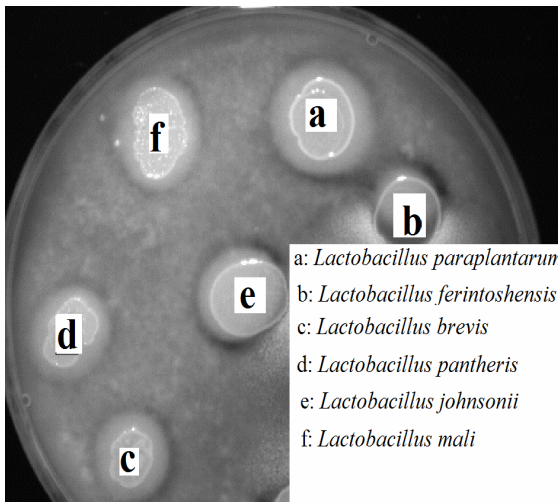
شکل ۲ درصد اتولیز شدن لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از شیر برحسب کاهش واحد دانسیته نوری (OD_{620nm}) سبز: ضعیف قرمز: متوسط تا نسبتاً خوب

یکی از موثرترین راه‌های تسریع در رسیدگی پنیر افزودن کشت‌های الحاقی به خصوص گونه‌های لاکتوباسیل می‌باشد که بهتر است برپایه پروفایل‌های آنزیمی و خصوصیات اتولیتیکی انجام شود. در مطالعه مشابهی که توسط حسن و همکارانش در جداسازی اسید لاکتیک باکتری‌ها از شتر در الجزایر انجام شد باکتری‌های شناسایی شده لاکتوباسیلوس رامنوسوز و لاکتوباسیلوس پلانتروم شدت اتولیز شدن را در حد خوب نشان دادند. شکل ۳ نشان می‌دهد که بیشترین تغییرات در کاهش pH بعد از ۲۴ ساعت مربوط به سویه‌های لاکتوباسیلوس پاراپلانتروم و لاکتوباسیلوس برویس به ترتیب می‌باشند. بر اساس مطالعاتی که محققین در گذشته انجام داده-



شکل ۴ فعالیت لیپولیتیکی لاکتوباسیل‌های جدا سازی شده از شیر شتر

a: *Lb. paraplantarum*, b: *Lb. ferintoshensis*, c: *Lb. brevis*, d: *Lb. pantheris*, e: *Lb. johnsonii*, f: *Lb. Mali*.



شکل ۵ فعالیت پروتئولیتیکی لاکتوباسیل‌های جدا سازی شده از شیر شتر

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه در بررسی برخی از خواص تکنولوژیکی جدایه‌های لاکتوباسیلی حاصل از شیر شتر که بر اساس فعالیت‌های لیپولیتیکی، پروتئولیتیکی، اتولیتیکی و قابیلیت تولید اسید انجام گردید جدایه‌های لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم، لاکتوباسیلوس برویس و لاکتوباسیلوس پانتریس به عنوان کاندیداهای مناسب برای فراوری شیر شتر و سایر محصولات لبنی دیگر پیشنهاد می‌شوند.

نشان دادند که این یک ویژگی مطلوب در صنعت تخمیر محسوب می‌شود. کاهش سریع pH در طی مراحل اولیه تخمیر پنبه اهمیت جدی برای کوآگولاسیون سریع، کاهش و جلوگیری از رشد فلور میکروبی غیرذاتی و خارجی دارد. سویه‌های تولیدکننده سریع اسید، انتخابی مناسب برای فرایندهای تخمیری لبنی به عنوان استارتر اولیه هستند درحالی‌که کشت‌های الحاقی بسته به خصوصیات مهم دیگرشان نظیر فعالیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی استفاده می‌شوند. شکل ۴ رسوب قابل روئیتی از کریستال‌های نمک کلسیم حاصل از اسید چرب آزاد شده توسط آنزیم لیپاز باکتری‌ها را نشان می‌دهد. بر اساس شکل ۴ و جدول ۳ تمام جدایه‌ها از فعالیت لیپولیتیکی مناسبی برخوردار بوده و لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم و لاکتوباسیلوس برویس بیشترین فعالیت لیپولیتیکی را نشان دادند.

جدول ۳ فعالیت لیپولیتیکی لاکتوباسیل‌های جدا سازی شده از شیر شتر

گونه باکتری	فعالیت لیپولیتیکی (unit/ml)
<i>L. pantheris</i>	۱۱,۳۳
<i>L. ferintoshensis</i>	۸
<i>L. brevis</i>	۱۴,۷۳
<i>L. paraplantarum</i>	۱۵,۷۵
<i>L. mali</i>	۸,۵
<i>L. johnsonii</i>	۹

فعالیت لیپولیتیکی باکترهای اسیدلاکتیک برای رشد باکتری‌ها در شیر و توسعه خصوصیات ارگانولپتیک محصولات شیر ضروری می‌باشد [۲۲ و ۲۳]. باکتری‌های اسید لاکتیک دارای فعالیت پروتئولیتیکی، کازئین موجود در محیطی نظیر پودر شیر پس چرخ را هیدرولیز کرده و هاله ایجاد می‌کنند. تمام لاکتوباسیل‌های جدا شده در این تحقیق قادر به چنین فعالیتی بوده و هاله ایجاد شده اطراف کلنی‌ها در شکل ۵ گویای این مطلب می‌باشد.

- [9] Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B. (2009). *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology*. 2nd edition. Vol (3), Springer Dordrecht Heidelberg London New York .598-599.
- [10] Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R. (2005). Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR Applications. *Anal Biochem*. 347: 333-5.
- [11] Bulut, Ç. (2003). *Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese: İzmir Institute of Technology, İzmir*.
- [12] Bettache, G., Fatma, A., Miloud, H and Mebrouk, K. (2012). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Their Major Technological Traits. *World Applied Sciences Journal*. 17 (4): 480-488.
- [13] Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. (2001). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from Beyas cheese made from raw ewes' milk. *J. App.Microbiol*. 91: 861-870.
- [14] Jini, R., Swapna, H.C., Amit Kumar, Rai., Vrinda. R., Halami, P.M., Sachindra, N.M., Bhaskar, N. (2011). Isolation and characterization of potential lactic acid bacteria (LAB) from freshwater fish processing wastes for application in fermentative utilisation of fish processing waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 1516-1525.
- [15] Yamada, K., Ota, U and Machinda, H.(1962). Studies on the production of lipase by microorganisms. Quantitative determination of lipase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 26:63-69.
- [16] Gatti, M., E. Fornasari, D. Garni, G. Giraffa and E. Neviani. (1994). Gli enterococchi nei formaggi italiani: attività biochimiche e significato tecnologica. *Industria del Latte*. 30:11-27.
- [17] Thiboutot, H., Dako, E., El-Soda, M., Vuilleumard, J.C., Power, N., Simard, R.E. (1995). Influence of heat and freeze shocking on the autolysis and peptidase activities of *Lactobacillus casei*. *Milchwissenschaft*. 50: 448-452.

۵- تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد که در انجام این پروژه مساعدت نموده‌اند تشکر نمایم.

۶- منابع

- [1] Ashmaig, A., Hasan, A and Gaali E. (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese fermented camel's milk (*Gariss*), *African Journal of Microbiology Research*, 3(8): 451-457.
- [2] Crow, V.L., Coolbear. T., Gopal, P.K., Martley, F.G., McKay, L.L. and Riepe, H. 1995. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *International Dairy Journal*, 5(8): 855-875.
- [3] Shamsia, S. M., (2009). Nutritional and therapeutic properties of camel and human milks. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*. 1(2): 052-058.
- [4] 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(1):3-11.
- [5] Hassaïne, O., Zadi-Karam, H and Karam, N. (2008). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from three breeds dromedary raw milks in south Algeria. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 20(1).
- [6] Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A and Zinedine, A. (2009). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological research*. 164(1):81-91.
- [7] Hassaïne, O., Zadi-Karam, H and Karam, N.E. (2007). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). *African Journal of Biotechnology*, 6(14).
- [8] Sweet, L.E., (1965). Camel Raiding of North Arabian Bedouin: A Mechanism of Ecological Adaptation I. *American Anthropologist*, 67(5):1132-50.

- [20] Wilkinson, M. G., Guinee, T. P., Callaghan, D. M.O and Fox, P. F. (1994). Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during cheese ripening. *Journal of Dairy Research*. 61:249-262.
- [21] Huggins, A. R., Sandine, W. E. (1984). Differentiation of fast and slow milk coagulating isolates in strains of streptococci. *Journal of Dairy Sciences*. 67:1674-1679.
- [22] Axelsson, L.(1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In:Salminen, S. and A. von Wright (Eds.). *Lactic Acid Bacteria:Microbiology and Functional Aspects.*, pp. 1-72. New York, Marcel Dekker.
- [23] Christensen, J. E., E. G. Dudley, J. A. Pederson and L. J. Steelz. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76:217-246.
- [18] Ayad, E. H. E., Nashat, S., El-Sadek, M., Metwaly, H and El-Soda, M. (2004). Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology*. 21:715-725.
- [19] Serikbayeva, A., Konuspayeva, G., Faye, B., Loiseau, G., Narmuratova, M. (2005). Probiotic properties of a sour-milk product : shubat from the camel milk. Desertification combat and food safety : the added value of camel producers. Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop, 19-21 April 2004, Ashgabad, Turkmenistan. Amsterdam : IOS Press, 187-191. (NATO sciences series, 362).

Isolation and Identification of *Lactobacillus* Bacteria from Raw Milk of Iranian One Humped Camel (*Camelus dromedarius*) and Evaluation of Their Technological Properties

Davati, N.¹, Tabatabaee yazdi, F.², Zibaee, S.^{3*}, Shahidi, F.⁴, Edalatian, M. R.⁵

1. PhD student Of Food Microbiology. Department of Food Science Industry. Ferdowsi University of Mashhad.

2. Associate Professor Professor, Department of Food Science Industry. Ferdowsi University of Mashhad.

3. Assistant professor, Razi Vaccine & Serum Research Institute.

4. Full Professor, Department of Food Science Industry. Ferdowsi University of Mashhad.

5. Assistant Professor, Department of Food Science Industry. Ferdowsi University of Mashhad.

(Received: 93/2/5 Accepted: 93/7/28)

Studies have shown that camel milk and its fermented products have therapeutic properties and high nutritional value. Lactic acid bacteria play important role in Fermented dairy products. The aim of this study is to determine the *Lactobacillus* community of camel milk. A total of 9 *Lactobacillus* were isolated from camel milk of Golestan province in Iran. The log₁₀ CFU of *Lactobacillus* per ml on MRS medium under anaerobic condition at 20, 37 and 45°C included 8.792± 0.14, 8.301±0.07 and 7.301±0.03 respectively. Isolates were identified on the basis of Biochemical and Phenotypic Characteristics as *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus ferintoshensis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pantheris*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus mali*. Presence of Lactic acid bacteria was confirmed by band formation of PCR product in 1500 bp (amplification 16S rRNA gene using B27F-U1492R universal bacterial primer). Evaluation of their technological properties of isolates showed that isolated *Lactobacillus* from camel milk have lipoliticity, Proteolytic activity and high acidifying activity (except for *Lb. mali* and *Lb. johnsonii*). Also, all isolates, except *Lb. Johnsonii*, have autolytic activity in fair level. Based on technological properties of isolates, *Lb. paraplantarum*, *Lb. Brevis* and *Lb. pantheris* are suggested as good candidates for camels milk processing or other fermentation process.

Keywords: Camel, Milk, *Lactobacillus*, Lipolytic, Proteolytic.

* Corresponding Author E-Mail Address: s.zibaee@mrazi.ac.ir