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

نفیسه دعوتی[1]، فریده طباطبائی یزدی[2]، سعید زیبائی[3]*، فخری شهیدی[4]، محمدرضا عدالتیان[5]

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
٤- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
٥- 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 ٤٥ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۸/۷۹۲±۰/۰۷، ۸/۳۰۱±۰/۱٤ و ۷/۳۰۱±۰/۰۳ بود. بر اساس خواص بیوشیمیایی و فنوتیپی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس فرینتوشنسیز*، *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس پانتریس*، *لاکتوباسیلوس جونسونی* و *لاکتوباسیلوس مالی* در این شیر شناسایی شدند. حضور اسیدلاکتیک باکتری‌ها توسط تشکیل باند محصول PCR در ۱۵۰۰bp تایید شد (تکثیر ژن 16S rRNA با پرایمرهای یونیورسال B27F و U1492R). بررسی خواص تکنولوژیکی جدایه‌ها نشان دادکه لاکتوباسیل‌های جدا شده دارای فعالیت لیپولیتیکی و پروتئولیتیکی 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 نسبتا خوب دارند. بر اساس بررسی خواص تکنولوژیکی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس پانتریس* کاندیداهای مناسبی برای فراوری شیر شتر و سایر محصولات لبنی دیگر پیشنهاد می‌شوند.

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

* مسئول مکاتبات: s.zibaee@mrazi.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

۱- مقدمه

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 ویژگی-های 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[1] 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، می-توان 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 پروتئازها 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 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 عمدتا 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*[2]، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*[3]، *استرپتوکوکوس سالیواریوس* زیرگونه *ترموفیلوس*[4]، *لاکتوباسیلوس کازئی* زیرگونه *کازئی*[5]، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* [٤]، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[6]، *لاکتوکوکوس رافینولاکتیس*[7]، *لاکتوباسیلوس انیمالیز*[8]، *لاکتوباسیلوس برویس*[9]، *لاکتوباسیلوس دایورژنز*[10]، *لاکتوباسیلوس رامانوسوز*[11]، *لاکتوباسیلوس گاسری*[12]، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*[13]، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*[14]، *لاکتوکوکوس الیمنتاریوم*[15] [٥]، *انتروکوکوس فکالیس*[16]، *انتروکوکوس فسیوم*[17] و *انتروکوکوس دورانس*[18] [٦] 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 *لاکتوکوکسی*،

1. Nonprotein-bound amino acids

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 gasseri*
13. *Lactobacillus paracasei*
14. *Lactobacillus fermentum*
15. *Lactococcus alimentarium*
16. *Enterococcus faecalis*
17. *Enterococcus faecium*
18. *Enterococcus durans*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

انتروکوکوسی و *لاکتوباسیلی* از شیر شتر، فعالیت پروتئولیتیکی خوبی نشان دادند و *لاکتوباسیل‌ها* از فعالیت پروتئولیتیکی و اتولیتیکی بیشتری نسبت به بقیه برخور بودند. سویه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* از لحاظ فعالیت اسیدیفیکاسیون نسبت به بقیه سریع‌تر عمل کردند و *لاکتوباسیلوس رامنوز*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ، *انتروکوکوس دورانس* و *انتروکوکوس 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 نمونه‌برداری انجام شد. ابتدا محل نمونه‌برداری (پستان شتر) با الکل ۷۰٪ ضدعفونی شد. سپس ٦ نمونه شیر از شترهای تک کوهانه منطقه گنبد استان گلستان تحت شرایط استریل جمع‌آوری شد و بلافاصله در دمای ٤ °C به آزمایشگاه محل تحقیق انتقال داده شدند. سپس بر روی محیط MRS (مرک، آلمان) از رقت‌های سریالی تهیه شده از نمونه (10^{-3} تا 10^{-7}) در پپتون واتر (مرک، آلمان)، کشت سطحی انجام گردید و تحت شرایط بی‌هوازی (جار بی‌هوازی وگاز پک نوع A (مرک، آلمان)) در دمای ۲۰ °C، ۳۷ و ٤٥ به مدت ٤٨ ساعت در ۳ تکرار گرمخانه‌گذاری (ویژین، کره) گردید. کلنی-های حاصل شده بر روی محیط MRS شمرده شده، آن‌هایی که از نظر شکل ظاهری و تحدب 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 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 ٦/٥ و ۱۸ درصد کلرید سدیم (مرک، آلمان)، دو دمای ۱۵ °C و ٤٥ °C، pH های ٤/٤ و٩/٦ و تولید گاز CO_2 از گلوکز مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این آزمایشات از محیط پایه MRS براث (مرک، آلمان) استفاده گردید و نمک در دو غلظت ٦/٥ 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 (لبترون، 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 کربوهیدرات-ها در MRS براث بدون قند حاوی ۱٪ محلول کربوهیدرات و ۰,۰۲۵٪ بروموکروزل ارغوانی (مرک، آلمان) به عنوان شاخص pH انجام شد. نتایج بعد از۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۰°C 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

میکرولیتر از الکل ایزوآمیل/کلروفرم (۲۴/۱) (مرک، آلمان) اضافه گردید و بعد از ورتکس کردن، مخلوط در ۱۶۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (اپندورف، آلمان) شد. سپس DNA الگو از فاز آبی برای واکنش PCR استفاده گردید [۱۰]. پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن 16S rRNA (5′-B27F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و U1492R (5′-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3′) (بایونیر، کره جنوبی) بودند [۷]. واکنش PCR به وسیله مخلوط کردن ۵ µl از DNA استخراج شده با ۲۵ µ از 2X PCR Master (سیناکلون، ایران)، ۱ µl از هریک از پرایمرهای B27F و U1492R با غلظت ۱۰picomole/µl و ۱۸ µl آب دیونایز توسط ترموسایکلر (اسکو، سنگاپور) با شرایط زیر انجام گردید: دناتوراسیون اولیه: ۹٤ °C به مدت ۵ دقیقه، سپس ٤۰ سیکل در ۹٤ °C (۱ دقیقه)، ۵٦ °C (۱ دقیقه) و ۷۲°C (۱ دقیقه). پس از توسعه نهایی در ۷۲ °C (۱۰ دقیقه)، تیوب‌ها در ٤°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.

۲-٤- ارزیابی کیفی فعالیت پروتئولیتیکی

فعالیت پروتئولیتیکی جدایه‌ها به وسیله کشت بر روی پلیت کانت آگار (مرک، آلمان) حاوی ۲٪ پودر شیر پس چرخ (مرک، آلمان) و بررسی هاله حاصل از پروتئولیز ایجاد شده توسط آن‌ها ارزیابی شد. هر جدایه با ایجاد هاله اطراف کلنی به عنوان باکتری با فعالیت مثبت پروتئولیتیکی 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 ٦ تنظیم گردید. این محیط توسط کشت تازه هر جدایه به میزان ۱۰٪ تلقیح شد و ۲٤ ساعت در ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری (ویژین، کره) گردید. فعالیت لیپولیتیکی توسط ظهور رسوب قابل روئیت 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].

۲-٦- ارزیابی کمی فعالیت لیپولیتیکی

جدایه‌های لاکتوباسیلی در MRS براث (مرک، آلمان) به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ °C (ویژین، کره) کشت گردیدند. کشت حاصل در ۸۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ (اپندورف، آلمان) گردید. محلول رویی برای ارزیابی کمی فعالیت لیپولیتیکی انتخاب گردید [۱۳ و۱٤]. فعالیت آنزیم لیپاز طبق روش یامادا و همکارانش[1] به صورت زیر در ۳ تکرار اندازه‌گیری شد: ۱ میلی لیتر محلول آنزیمی به ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۰٫۲ مولار با pH =۷ 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 فتالئین ۱٪ به آن افزوده و با سود ۰٫۰۵ نرمال تیتر گردید. حجم سود مصرفی جهت تیتر 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 ۳۷ °C و بافر فسفات با pH= ۷، از سوبسترا آزاد نماید. طبق فرمول زیر فعالیت آنزیم در هر میلی لیتر محاسبه گردید[۱۱]. فعالیت لیپاز[Unit/ml] = U؛ نرمالیته سود مصرفی = N؛ حجم سود مصرفی =V ؛ مدت زمان = t.

$$U = \frac{N \times (V1 - V2) \times 1000}{t}$$

1. *Yamada et al*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

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 براث (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 ٢٤ ساعت گرمخانه-گذاری (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 پتاسیم۱۰ میلی-مولار با pH=۵٫۵ حاوی ۱مولار کلرید سدیم تعلیق سازی و تا OD_{620} معادل ۱ رقیق سازی گردید. سوسپانسیون سلولی در معرض یک سیکل انجماد (۲۰- درجه سانتی‌گراد، ٢٤ ساعت) و خروج از انجماد قرار گرفته سپس در°C ۳۷ گرمخانه‌گذاری (ویژین، کره) شدند. میزان فعالیت اتولیتیکی توسط اندازه‌گیری کاهش درصد جذب در٦٢٠ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS (شیمادزو، ژاپن) و بر اساس فرمول زیر بررسی شد(١٦و ١٧). شدت اتولیز به صورت زیر محاسبه گردید:

A_t= جذب A_0 = جذب اولیه $(A_0 - A_t) \times ۱۰۰/A_0$

اندازه گیری شده بعد از t زمان گرمخانه گذاری شده براساس این فرمول، لاکتوباسیل‌ها از نظر اتولیز شدن براساس معیار تشریح شده توسط آیاد و همکارانش[1] به این صورت درجه‌بندی می‌شوند: خوب=۷۰-۹٦، نسبتا خوب= ٤۰-٦۹ و ضعیف= ۰-۳۹ [۱۸].

۳- نتایج و بحث

جدول ۱ نشان می‌دهد که بیشترین تعداد تشکیل دهنده کلنی در دمای ^0C ۲۰ حاصل شده است. ۹ لاکتوباسیل به وسیله کشت بر روی محیط MRS از شیر شتر جداسازی گردید.

1 Ayad *et al*

جدول ۱ لگاریتم تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی لاکتوباسیل در میلی‌لیتر

محیط کشت	دمای گرمخانه‌گذاری (^0C)	Log CFU/mL
MRS	۲۰	۸٫۷۹۲±۰٫۱٤
MRS	۳۷	۸٫۳۰۱±۰٫۰۷
MRS	٤٥	۷٫۳۰۱±۰٫۰۳

بر اساس مطابقت با راهنمای برگیس، آزمون‌های بیوشیمیایی و فنوتوپیکی نشان دادند که این ۹ باکتری مربوط به ٦ 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 ناجر، تارگوی و رگویبی[2] گله‌های صحرایی در جنوب الجزایر انجام دادند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[3]، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*[4] و *لاکتوباسیلوس رامنوسوز*[5] جداسازی شدند [۱۸]. همچنین حضور *لاکتوباسیلوس برویس*[6]، *لاکتوباسیلوس ساکی*[7] و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*[8] در جداسازی اسید لاکتیک باکتری-های موجود در شابوت (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. شکل۱ ایجاد باند معادل ۱۵۰۰bp (با مقایسه با مارکر۱۰۰۰bp) از تکثیر ژن16S rDNA لاکتوباسیل‌های جدا شده از شیر شتر را نشان می‌دهد. تکثیر ژن16S rDNA باکتری‌های اسید لاکتیک باید محصول ۱۵۰۰bpحاصل کند. توانایی سویه‌ها به لیز شدن و آزاد کردن آنزیم‌های درون سلولی در طی رسیدگی پنیر، ویژگی مطلوبی در صنعت محسوب می‌شود [۲۰].

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

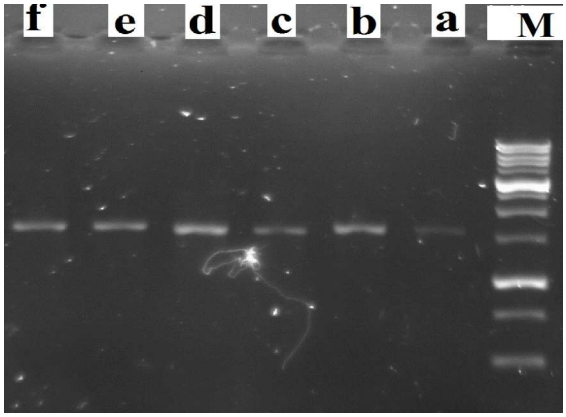
[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

جدول ۲ مشخصات فنوتوپیکی لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از شیر شتر

باکتری	گروه A (هوموفرمنتاتیو اجباری)			گروه B(هتروفرمنتاتیو اختیاری)	گروهC (هتروفرمنتاتیو اجباری)	
شناسایی شده	*L. pantheris*	*L. mali*	*L. johnsonii*	*L. paraplantarum*	*L. ferintoshensis*	*L. brevis*
شماره جدایه	۸،۹	۷	٦	۳،٤،٥	۲	۱
رشد در :						
۱۵/ ٤٥ (°C)	+/-	+/+	+/+	+/−	+/−	+/−
٦،٥٪کلرید سدیم	−	+	+	+	+	+
۱۸٪ کلرید سدیم	−	−	−	−	−	−
pH=٤،٤	+	+	+	−	−	−
pH=۹،٦	−	−	−	−	−	−
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 NH3 از آرژنین					+	+

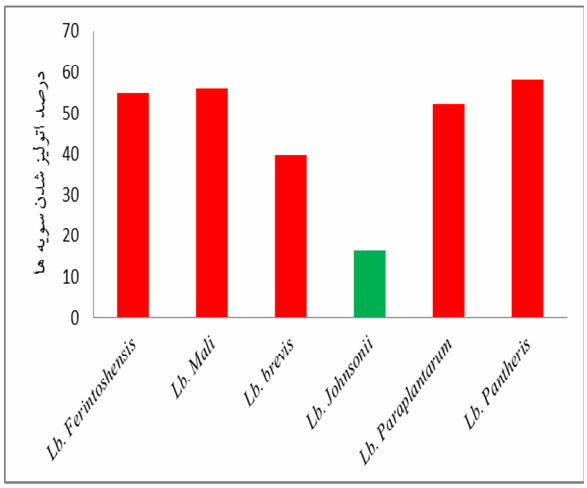
شکل۲ نشان می‌دهد تمام لاکتوباسیل‌های جداشده از شیر شتر به غیر از *لاکتوباسیلوس جونسونی* بر اساس معیار طبقه‌بندی، قابلیت اتولیز شدن در حد نسبتا خوب را دارند و *لاکتوباسیلوس پانتریس* دارای بیشترین امتیاز اتولیز شدن می باشد. کشت‌هایی با شدت بالای اتولیزاسیون در تولید پنیر به دلیل رهایش سریع‌تر آنزیم‌های لیپولیتیکی و پروتئولیتیکی که در تشکیل طعم محصولات تخمیری لبنی می‌تواند موثر باشد از اهمیت بالایی برخوردار هستند.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]



شکل۱ نتایج تکثیر ژن 16S rRNA با پرایمرهای یونیورسال B27F و U1492R لاکتوباسیل‌های جدا شده از شیر شتر

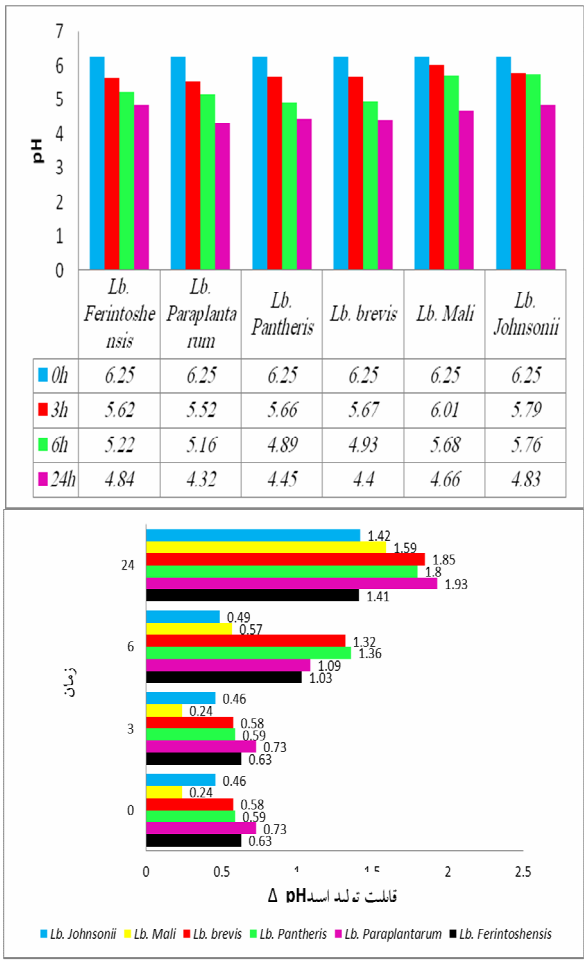
Lb. brevis (a), *Lb. ferintoshensis* (b), *Lb. paraplantarum* (c), *Lb. johnsonii* (d), *Lb. mali*(e), *Lb. pantheris* (f)



شکل ۲ درصد اتولیز شدن لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از شیر برحسب کاهش واحد دانسیته نوری (OD_{620nm})

سبز: ضعیف قرمز: متوسط تا نسبتا 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 پلانتاروم* شدت اتولیز شدن را در حد خوب نشان دادند. شکل ۳ نشان می‌دهد که بیشترین تغییرات درکاهش pH بعد از ۲۴ ساعت مربوط به سویه‌های *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس برویس* به ترتیب می‌باشند. بر اساس مطالعاتی که محققین در گذشته انجام داده‌اند بایستی باکتری‌های اسید لاکتیک مناسب استارتر بعد از گذشت ٦ ساعت از کشت pH معادل ۰٫۲± ۵ حاصل کنند و یک باکتری تولید کننده سریع اسید باید به مدت ۳ ساعت اختلاف pH معادل واحد ۰٫٤ = ΔpH حاصل کند.



شکل ۳ نمودار میله‌ای تغییرات pH لاکتوباسیل های جداسازی شده از شیر شتر در طی ۲٤ 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 شکل۳ همگی لاکتوباسیل‌های جدا شده از شیر شتر به غیر از *لاکتوباسیلوس مالی* قادر به ایجاد ΔpH معادل۰٫٤ واحد بعد از ۳ ساعت می‌باشند همچنین نشان داده شد همه جدایه‌ها غیر از *لاکتوباسیلوس مالی* و *لاکتوباسیلوس جونسونی* بعد از گذشت ٦ ساعت از کشت قادر به ایجاد pH معادل ۰٫۲± ۵ می‌باشند که به عنوان استارتر قوی در صنعت می‌توانند پیشنهاد شوند. براساس نتایج *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس پانتریس* شیب تغییرات pH بالایی در ٦ ساعت اولیه کشت

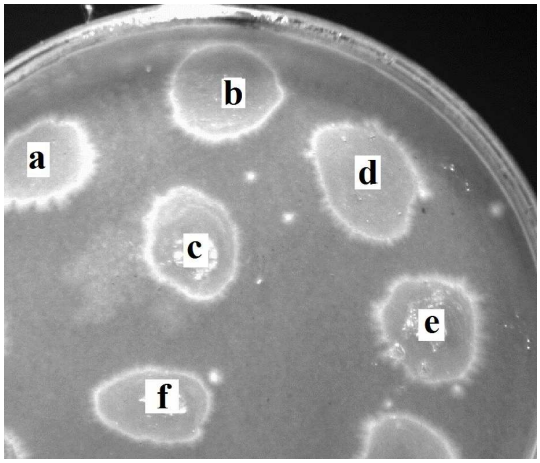
[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

نشان دادند که این یک ویژگی مطلوب در صنعت تخمیر محسوب می‌شود. کاهش سریع pH درطی مراحل اولیه تخمیر پنیر 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 ٤ رسوب قابل روئیتی از کریستال‌های نمک کلسیم حاصل از اسید چرب آزاد شده توسط آنزیم لیپاز باکتری‌ها را نشان می‌دهد. بر اساس شکل ٤ 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 جداسازی شده از شیر شتر

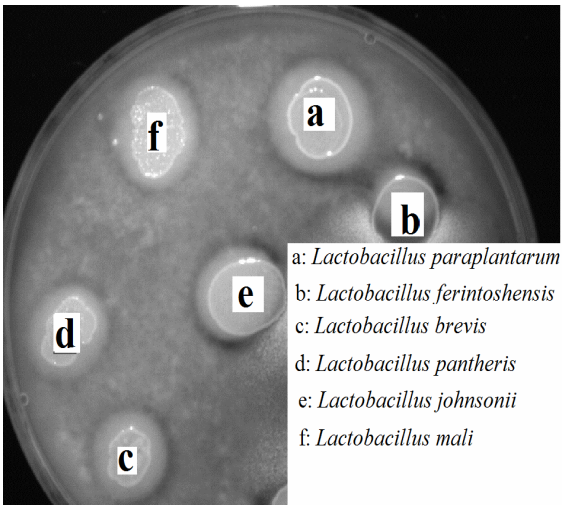
گونه باکتری	فعالیت لیپولیتیکی (unit/ml)
L. pantheris	۱۱,۳۳
L. ferintoshensis	۸
L. brevis	۱٤,۷۳
L. paraplantarum	۱۵,۷۵
L. mali	۸,۵
L. johnsonii	۹

فعالیت لیپولیتیکی باکترهای اسیدلاکتیک برای رشد باکتری‌ها در شیر و توسعه خصوصیات ارگانولپتیک محصولات شیر ضروری می‌باشد [۲۲و 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.



شکل ٤ 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

٤- 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 قابلیت 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

۵- تشکر و قدردانی

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

٦- 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 Adaptation1. *American Anthropologist*, 67(5):1132-50.

[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). Iso*solation 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).Iaolation 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: attivita biochimiche e signifato technologica. *Industria del Latte*. 30:11-27.

[17] Thiboutot, H., Dako, E., El-Soda, M., Vuillemard, JC., 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

[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).

[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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]

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 $\log_{10}$ *CFU* of *Lactobacillus* per ml on MRS medium under anaerobic condition at 20, 37 and 45^0C 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 lipoliticy, 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-09]