جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌های لاکتوباسیلوس با پتانسیل پروبیوتیکی از شیر گاوی و ماست سنتی شهرستان خوی

طاهره نریمانی[۱]، علیرضا تاری‌نژاد [۲*]، محمدامین حجازی[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز.

۲- دکتری، دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز.

۳- فوق دکتری، استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور، تبریز.

(تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۸)

چکیده

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی به مقدار کافی مصرف شوند سلامتی را به میزبان اعطا می‌کنند. باکتری‌های لاکتیک اسید، متداول‌ترین نوع باکتری‌هایی هستند که به عنوان پروبیوتیک معرفی شده‌اند و در محصولات لبنی سنتی وجود دارند. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک از فلور موجود در شیر گاوی و ماست سنتی شهرستان خوی می‌باشد. برای رسیدن به این هدف، سویه‌های جدا شده توسط روش‌های فنوتیپی (مورفولوژی، رنگ و پیگمان کلنی، رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست‌های بیوشیمیایی شامل رشد در دماهای ۱۰، ۱۵ و ۴۵ درجه سانتیگراد و غلظت‌های ۴٪ و ۶/۵٪ نمک و نیز تخمیر ۱۷ نوع قند) جداسازی و شناسایی شدند و پتانسیل پروبیوتیکی آن‌ها (مقاومت به اسید معده و نمک‌های صفراوی) مورد ارزیابی قرارگرفت. سپس برای شناسایی دقیق‌تر با جفت آغازگرهای اختصاصی، ژن 16S rRNA باکتری‌های لاکتوباسیلوس تکثیر داده شد و بعد از خالص‌سازی محصول PCR، ژن مورد نظر برای توالی‌یابی ارسال گردید. در مجموع ۱۴ سویه لاکتوباسیلوس به عنوان فلور میکروبی طبیعی دارای پتانسیل پروبیوتیکی در منطقه خوی گزارش شد که کیفیت محصولات لبنی این منطقه را تأمین می‌نمایند و پتانسیل کاربرد در محصولات لبنی تولید شده در صنعت را دارا می‌باشند.

کلید واژگان: پروبیوتیک، ژن 16S rRNA، لاکتوباسیلوس

* مسئول مکاتبات: atarinejad@yahoo.com

۱- مقدمه

غذاهای پروبیوتیک به عنوان محصولی عمل‌آوری شده که حاوی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک زنده در مقادیر کافی باشند معرفی می‌شوند [۱و۲]. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با قرار گرفتن در محیط روده می‌توانند تعادل میکروبی را در جهت افزایش سودمندی آن‌ها اصلاح کنند و با فعالیت خود مانع از فعالیت میکروارگانیسم‌های غیر مفید و بیماریزا شوند [۳]. از جمله مزایای غذاهای پروبیوتیک در سلامتی انسان می‌توان به مواردی از قبیل پیشگیری از اسهال، متعادل کردن میکروفلور روده، کاهش کلسترول، اصلاح عدم تحمل لاکتوز، بهبود سیستم ایمنی، پیشگیری از سرطان، پایین آوردن فشار خون، کاهش التهاب، کاهش نشانه‌های آلرژیک، مهار میکروارگانیسم‌های بیماریزا، پیشگیری از پوکی استخوان و پیشگیری از عفونت‌های ادراری- تناسلی اشاره نمود [٤و٥]. امروزه تولید محصولات پروبیوتیک وسعت جهانی یافته است و بیشتر مشتریان به افزایش سطح سلامت خود توسط این محصولات توجه خاصی دارند. اولین محصولات پروبیوتیکی شیر تخمیر شده در اروپا در سال ۱۹۸۰ میلادی معرفی شدند. در سال ۲۰۰۲ میلادی در حدود ۵ میلیارد دلار از بازار غذاهای فراسودمند، به محصولات پروبیوتیک تعلق داشت. همچنین میزان فروش سالیانه ماست‌های حاوی پروبیوتیک در جهان رقمی حدود ۱۰ میلیارد دلار را به خود اختصاص می‌دهد [٦]. از میان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، باکتری‌های لاکتیک اسید به عنوان مهم‌ترین گروه شناخته شده‌اند که در این میان جنس لاکتوباسیل به عنوان متداول‌ترین ارگانیسم‌های به کار رفته در تولید محصولات پروبیوتیکی مطرح می‌باشد [۳]. باکتری‌های لاکتیک اسید که به عنوان کشت آغازگر به شیر اضافه می‌شوند یا به صورت ذاتی و طبیعی در شیر وجود دارند، نقش مهمی را در طعم و عطر محصولات لبنی بازی می‌کنند [۷و۸]. جنس لاکتوباسیل به دلیل توانایی‌شان در تخمیر و نیز اهمیت‌شان در سلامتی انسان به عنوان پروبیوتیک مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند و با توجه به اثر ممانعت از رشدی که این باکتری‌ها بر روی باکتری‌های بیماریزا دارند سعی بر آن است تا از این باکتری‌ها یا باکتریوسین‌های خالص شده آن‌ها به عنوان نگهدارنده بیولوژیکی در صنعت غذا استفاده شود [۱و۹]. Najett و همکاران (۲۰۱۲) فعالیت آنتی میکروبی مجموعه‌ای از باکتری‌های پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس پاراکازئی و گونه‌ای از بیفیدوباکتریوم روی باکتری بیماریزای سالمونلا مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که کلونیزاسیون سویه‌های پروبیوتیک در روده‌ی موش‌ها، تعداد و همچنین عفونت به سالمونلا را به میزان زیادی، کاهش می‌دهد [۱۰]. تحمل اسیدیته بالا و مقاومت به نمک‌های صفراوی از جمله خصوصیات پروبیوتیکی است [۱۱] که در این پژوهش برای غربالگری سویه‌هایی با پتانسیل پروبیوتیکی در نظر گرفته شده است. شناسایی سویه‌های غربال شده، با استفاده از تست های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی صورت گرفت و برای شناسایی دقیق‌تر از روش مولکولی 16S PCR-rRNA و توالی‌یابی استفاده شد [۱۲]. بررسی ساختار ژن 16S rRNA نشان می‌دهد که تقریباً حاوی ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید و در چند نسخه در کل ژنوم باکتری می‌باشد. از بین ژن‌های مربوط به پروکاریوت‌ها، ژن 16S rRNA اغلب به عنوان یک ژن هدف در اکثر مطالعات تنوع باکتریایی مطرح می‌باشد. این ژن به عنوان یک نشانگر عمومی دارای توالی حفاظت شده بوده و همچنین ثبات و پایداری بالایی را از نظر عملکرد دارا می‌باشد و از آن به عنوان زمان سنج تکامل یاد می‌شود [۱۱]. در ایران و جهان مطالعات زیادی در زمینه جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک صورت گرفته است. قطبی و همکاران (۲۰۱۰) بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی موفق به شناسایی لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس پاراکازئی و لاکتوباسیلوس پنتوسوس از پنیر لیقوان شدند [۱۳]. لطفی و همکاران (۲۰۱۰) با توالی‌یابی ناحیه 16S rRNA، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و انتروکوکوس هیرا را در پنیر مناطق هریس و سراب شناسایی کردند [١٤]. در تحقیقات مشابه حسنی و همکاران (۲۰۱۱) باکتری‌های لاکتوباسیلوس را از پنیر سنتی لیقوان جداسازی و شناسایی نمودند که در میان سویه های جدا شده، گونه‌های غالب متعلق به گونه پلانتاروم و گونه کازئی بودند [۱۵]. حجازی و همکاران (۲۰۱۲) از ۲۲ ایزوله جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی، ۸ ایزوله را به طور دقیق با دو روش ARDRA و توالی‌یابی شناسایی نمودند که شامل پنج گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم، دو گونه لاکتوباسیلوس برویس و یک گونه لاکتوباسیلوس کازئی می باشند [١٦]. تفویضی و همکاران (۲۰۱۳) از غذای سنتی

ترخینه و دوغ ترخینه بر اساس توالی 16S rRNA، چهار سویه با تشابه ۹۹٪ به لاکتوباسیلوس کازئی و توانایی تولید باکتریوسین قوی‌تر را شناسایی و ثبت نمودند [۱۷]. در یک بررسی Natalia و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که نمونه‌های پنیر تازه تولید شده با شیر تخمیری حاوی باکتری‌های پروبیوتیک، در روز ۲۸ ذخیره‌سازی دارای 10^{8} و 10^{7} CFU/g باکتری‌های پروبیوتیک با خاصیت عملکردی ویژه می‌باشند [۱۸]. با توجه به سودمندی‌های گفته شده و همچنین روند رو به رشد مصرف محصولات لبنی پروبیوتیک در جهان و کشورمان، به بررسی پتانسیل پروبیوتیکی شیر و ماست محلی شهرستان خوی پرداخته شد تا با جداسازی و شناسایی سویه های بومی با خواص پروبیوتیکی، به منظور امکان استفاده در محصولات لبنی منطقه به عنوان محصولات پروبیوتیک معرفی گردند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌برداری

نمونه‌های شیر و ماست سنتی از شهرستان خوی جمع آوری و در فالکون‌های استریل و در درون بسته‌های یخی به آزمایشگاه منتقل گردیدند و تا شروع آزمایش در دمای یخچال نگهداری شدند.

۲-۲- تهیه سوسپانسیون باکتریایی و کشت اولیه

تهیه سوسپانسیون باکتریایی از نمونه‌های شیر و ماست با استفاده از PPS[1] (محلول پپتون فیزیولوژیکی استریل: ۸/۵ گرم بر لیتر کلرید سدیم و ۱ گرم بر لیتر پپتون باکتریولوژیکی) انجام شد. ابتدا حدود ۱۰ گرم از نمونه های ماست با استفاده از یک قاشقک استریل و ۱۰ میلی لیتر از نمونه‌های شیر برداشته شد و هر کدام به صورت جداگانه به ۱۰۰ میلی‌لیتر PPS استریل انتقال گردید و به آرامی تکان داده شد تا میکروارگانیسم‌ها جدا شوند. بعد از نیم ساعت ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های تهیه شده به صورت جداگانه، به ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت MRS[2] (شرکت سیگما- آلدریچ آمریکا) مایع انتقال یافت تا باکتری‌ها به حداکثر مقدار خود برسند و در شرایط کم هوازی (شرایط اتمسفری با فشار اکسیژن پائین) و دردمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه (شرکت Binder آلمان، مدل B34) گردید. تمامی این مراحل در زیر هود لامینار (شرکت ژال ایران، مدل JLB VI2Ors) و شرایط استریل انجام شد [۱۹].

۲-۳- غربال جمعیت باکتریایی اولیه و انتخاب سویه‌های مقاوم به اسید

بعد از کشت ۲۴ ساعته از نمونه‌های شیر و ماست در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، ۱۰ میلی‌لیتر از کشت‌های باکتریایی به بافر PBS[3] با pH= ۳ تلقیح شدند. سپس نمونه‌های تلقیح شده در بافر PBS به مدت ۲/۵ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند و بعد از ۲/۵ ساعت انکوباسیون، برای جداسازی باکتری‌های مقاوم به اسید، باکتری‌های زنده مانده (باکتری‌های مقاوم به اسید) در شرایط اسیدی با استفاده از سانتریفیوژ (شرکت Heraeus آلمان، مدل megafuge1.0) ترسیب و به محیط کشت MRS مایع، به منظور غنی‌سازی انتقال یافتند. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتیگراد انکوبه شدند. بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با استفاده از سرم فیزیولوژیکی استریل (کلریدسدیم: ۸/۵ گرم بر لیتر) تا ده برابر رقیق شدند و از هر رقت ۱ میلی‌لیتر و به صورت کشت آمیخته[4] در محیط کشت MRS آگار (شرکت سیگما- آلدریچ آمریکا) کشت داده شدند. پلیت‌ها در شرایط کم هوازی و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۴۸-۷۲ ساعت انکوبه گردیدند. از پلیت‌های دارای کلنی های قابل شمارش، حدود ۱۰ درصد از کلنی‌ها با مورفولوژی متفاوت جداسازی و روی محیط کشت MRS آگار خالص‌سازی شدند سپس همه سویه‌ها با استفاده از میکروسکوپ، رنگ‌آمیزی گرم (شرکت سیگما- آلدریچ آمریکا) و واکنش کاتالاز بررسی شدند. باکتری‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی در محیط کشت MRS مایع با ۲۵٪ گلیسرول استریل و ۲۵٪ Skim milk (شرکت Merck آلمان) در دمای ۸۰- درجهٔ سانتیگراد نگهداری شدند [۲۰].

1. Physiological Peptone Solution
2. Man, Rogosa & Sharp
3. Phosphate Buffered Saline
4. Pour plate

۲-٤- آزمایش‌های میکروبی

۲-٤-۱- تعیین درصد بقای سویه‌ها در شرایط اسیدی معادل با شرایط اسیدی معده

سویه‌های جدا شده، در محیط MRS مایع و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ٢٤ ساعت رشد داده شدند. یک میلی‌لیتر از هر کشت باکتریایی در ۹ میلی‌لیتر PBS با pH برابر با ۲/۵ تلقیح شدند و نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند. برای تعیین درصد بقاء، CFU[1] در لحظه تلقیح و در انتهای انکوباسیون ۳ ساعته در محیط معدنی PBS، برای هر سویه به صورت جداگانه تعیین گردید. برای تعیین CFU به ازای هر میلی‌لیتر، در زمان صفر (لحظهٔ تلقیح) و در انتهای ساعت ۳، از کشت‌های باکتریایی اولیه و تلقیح شده در محیط PBS به صورت سریالی تا ۱۰ برابر رقت‌سازی با سرم فیزیولوژی و برای هر رقت دو کشت به صورت پورپلیت انجام گردید و پلیت‌ها به صورت کم هوازی و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲-۳ روز انکوبه شدند. در پایان مدت انکوباسیون، پلیت‌ها از انکوباتور (شرکت Binder آلمان، مدل B34) برداشته شدند و برای حضور کلنی‌های قابل مشاهده بررسی شدند. پلیت‌های دارای تعداد قابل شمارش از کلنی‌ها و به طور معمول پلیت‌های دارای ۳۰ الی ۳۰۰ کلنی، برای شمارش انتخاب شدند و تعداد کلنی‌های هر پلیت یادداشت گردید. تعداد کلنی‌های تقریباً یکسان در پلیت‌های تکراری[2] در هر سطح رقت و همچنین اختلاف تقریباً ۱۰ برابری کلنی‌ها در رقت‌های متوالی صحت شمارش را نشان داد و در نهایت CFU برای هر کشت باکتریایی محاسبه گردید [۲۰].

۲-٤-۲- تعیین مقاومت سویه‌ها به نمک‌های صفراوی

محیط کشت MRS مایع به عنوان کنترل و MRS مایع دارای ۰/۳ درصد املاح صفراوی (شرکت Merck آلمان) به عنوان کشت مورد آزمایش (تیمار) به طور همزمان با یک درصد از کشت باکتریایی فعال ٢٤ ساعته تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. رشد در کشت‌های کنترل و تیمار، هر نیم ساعت یک بار با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ٦۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری GENESYS^{TM}5 (شرکت Milton Roy آمریکا) کنترل شد. برای محدود کردن جذب نوری به رشد باکتریایی، جذب نوری محیط‌های کنترل و تیمار در طول موج ٦۰۰ نانومتر با استفاده از MRS مایع و MRS مایع دارای ۰/۳ درصد بایل بدون تلقیح باکتریایی، صفر شد. رشد به مدت ۷ ساعت دنبال شد و منحنی جذب بر اساس زمان انکوباسیون رسم گردید. منحنی‌های رشد برای هر سویه رسم و بر اساس اختلاف زمانی در جذب‌های نوری متوالی بین کشت‌های کنترل و تیمار تحلیل شد. این اختلاف بر حسب دقیقه بیان و به عنوان تأخیر در رشد در نتیجهٔ اثر بازدارندگی نمک‌های صفراوی در نظر گرفته شد [۲۱].

۲-۵- آزمایشات بیوشیمیایی

براساس روش‌های توصیه شده Bergey در کتاب Garitty و همکاران و Holzapfel & Wood شناسایی مورفولوژیکی سویه‌ها با استفاده از تست کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم، رشد در دماهای ۱۰، ۱۵ و ٤۵ درجه سانتیگراد و رشد در غلظت‌های مختلف نمک (٦/۵ و ٤ درصد حجمی- وزنی کلرید سدیم در محیط کشت MRS مایع) انجام شد [۲۲و۲۳].

۲-۵-۱- تعیین الگوی تخمیر کربوهیدرات‌ها

الگوهای تخمیر کربوهیدرات‌ها شامل آرابینوز، اینوزیتول، ترهالوز، رافینوز، رامنوز، ریبوز، زایلوز، ساکارز، سلوبیوز، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز، لاکتوز، مانوز، مانیتول، ملوبیوز، ملوزیتوز (شرکت Merck آلمان)، برای همه سویه‌ها در محیط کشت MRS مایع دارای معرف فنل قرمز (شرکت Merck آلمان) (۰/۵ گرم بر لیتر) تعیین گردید. محیط کشت پایه برای انجام واکنش از اجزای اصلی و با حذف گلوگز و عصارهٔ گوشت و با افزودن فنل قرمز تهیه گردید. همهٔ قندها به صورت محلول استوک ۵٪ تهیه و بوسیلهٔ یک فیلتر غشایی ۰/۲ میکرومتر استریل گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول قندهای استریل به ٤/۵ میلی‌لیتر محیط کشت پایه افزوده شد. نمونه‌های جدا شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت ٢٤ ساعت کشت داده شدند و ۵۰ میکرولیتر از کشت فعال به محیط دارای قندهای اختصاصی تلقیح و به منظور مشاهدهٔ واکنش های تأخیری به مدت ۵ الی ۷ روز در دمای ایزولاسیون (۳۷

1. Colony Forming Unit
2. Duplicate plates

درجه سانتیگراد) انکوبه گردیدند. در پایان مدت انکوباسیون، نتایج بر اساس تغییر رنگ معرف فنل از قرمز به زرد ارزیابی و درحالت مثبت و منفی ثبت گردید [۲۴].

۲-۶- آزمایشات مولکولی

۲-۶-۱- استخراج DNA[1]

استخراج DNA با استفاده از روش Cardinal و لیز بافر انجام شد. ترکیبات لیز بافر (شرکت Merck آلمان) شامل تریس ۱ مولار با pH= ۷/۵، کلرید سدیم ۵ مولار، EDTA ۰/۵ مولار و SDS ۲ درصد و آب مقطر می‌باشد. برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از ژل آگارز (شرکت Merck آلمان) ۰/۸ درصد در الکتروفورز به کار گرفته شد [۲۵].

۲-۶-۲- انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تکثیر قطعه ژن 16S rRNA[2]

پرایمرهای اختصاصی (شرکت سیناژن) برای تکثیر قطعه ژن 16S rRNA برای سویه‌های لاکتوباسیلوس با استفاده از نرم افزار Oligo5 و با کمک توالی‌های 16S rRNA موجود در سایت بانک ژنی NCBI [3] طراحی گردید و واکنش PCR[4] با پرایمرهای

LF(5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') و

LR(5'AAGGTTACCTCACCGACTTC3')

اختصاصی سویه‌های لاکتوباسیلوس انجام شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز با مرحله واسرشته‌سازی[5] اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ٤ دقیقه، ۳۰ چرخه با مرحله واسرشته‌سازی در ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و بسط در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و سرانجام یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. واکنش PCR با (۱۲/۵ µl) Master mix (شرکت سیناژن)، پرایمر مستقیم و معکوس هر کدام (۰/٤ µM) و (۵۰ ng/ µl) DNA و رساندن حجم نهایی واکنش با آب مقطر استریل به حجم به ۲۵ میکرولیتر انجام شد [۲٦].

۲-۶-۳- تفکیک قطعات تکثیریافته

برای تفکیک قطعات تکثیریافته از ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. بدین ترتیب که نمونه‌های تکثیر یافته به نسبت ٦ به ۱ با بافر بارگذاری مخلوط و در چاهک‌های ژل بارگذاری شدند. پس از اتمام الکتروفورز (شرکت VWR Scientific، مدل VWR105)، ژل مورد نظر توسط اتیدیوم بروماید (شرکت Merck آلمان) رنگ‌آمیزی و نوارهای تکثیر یافتهٔ DNA در همهٔ نمونه‌ها به صورت تک نوار و با اندازهٔ تقریبی ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید و با غلظت‌های مناسب با استفاده از نور UV مشاهده و عکس‌برداری انجام گرفت (شرکت Biometra آلمان، مدل BioDocAnalyze).

۲-۶-٤- خالص‌سازی محصول PCR

با توجه به دستورالعمل کیت خالص‌سازی (شرکت سیگما-آلدریچ آمریکا) از ژل آگارز، محصول PCR تخلیص گردید.

۲-۷- ارسال جهت توالی‌یابی

سویه‌ها در تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری در حجم‌های ۵۰ میکرولیتر به همراه دو پرایمر مستقیم و معکوس (با غلظت‌های ۵۰ پیکومول بر میکرولیتر) در حجم‌های ۵۰ میکرولیتر، برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

۲-۸- نرم‌افزار آماری و بیوانفورماتیکی

نتایج بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS13 برای لاکتوباسیلوس‌ها مورد تجزیه قرارگرفته و گروه‌بندی به عمل آمد. هم ردیف کردن مربوط به توالی‌یابی ژن 16S rRNA سویه‌ها با استفاده از برنامه بیوانفورماتیکی BLAST[6] در NCBI و ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از MEGA4[7] انجام شد.

۳- نتایج و بحث

از دو محصول شیر و ماست سنتی شهرستان خوی، در کل ۱٤ سویه باکتری لاکتوباسیلوس در محیط کشت MRS جداسازی گردید. عدالتیان و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای نشان دادند که محیط MRS آگار برای باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس مناسب بوده و این جنس در این محیط غالب می‌باشد [۷]. تفکیک سویه‌ها و نامگذاری آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

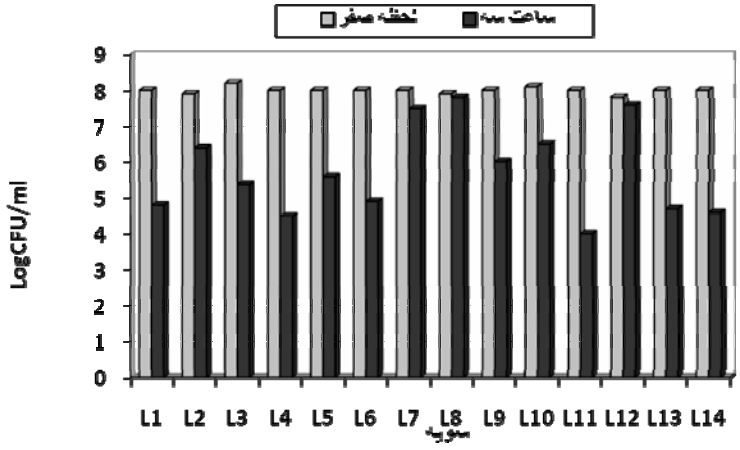
1. Deoxyribonucleic acid
2. 16S ribosomal RNA
3. National Center for Biotechnology Information
4. Polymerase Chain Reactoin
5. Denaturation
6. Basic Local Alignment Search Tool
7. Molecular Evolutionary Genetics Analysis

جدول ۱ سویه‌های جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی

سویه‌های لاکتوباسیلوس	نمونه لبنی
L1, L2, L4, L5, L7, L8, L11, L12, L13	شیر گاو خوی
L3, L6, L9, L10, L14	ماست گاو خوی
۱٤	کل نمونه‌ها

*L نشان دهنده سویه‌های لاکتوباسیلوس می‌باشد.

تعیین تحمل به اسیدیته برای تمام ۱٤ سویه، در بافر PBS با pH برابر با ۲/۵ به طول سه ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد که نتایج در جدول ۲ گزارش شده است. براساس درصد بقاء، سویه‌ها به ۳ گروه مقاومت متوسط، مقاومت خوب و مقاومت بسیار خوب تقسیم شدند. براساس این نتایج، ٦ سویه باسیلی شکل مقاومت متوسط و ۵ سویه باسیلی شکل مقاومت خوب و سویه‌های L7, L8 و L12 مقاومت بسیار خوبی را دارا بودند. در شکل ۱ شمارش تعداد کلنی سویه‌های باکتریایی، در لحظه تلقیح و بعد از انکوباسیون سه ساعته در شرایط اسیدی معادل با اسید معده آورده شده است.



شکل ۱ تأثیر محیط اسیدیPBS با pH=۲/۵ در لحظه صفر و بعد از انکوباسیون سه ساعته بر روی بقای سویه‌های لاکتوباسیلوس

جدول ۲ تعیین درصد بقای سویه‌ها در pH=۲/۵ به مدت ۳ ساعت

درصد بقاء / محصولات	بیشتر از ۸۰ ٪	بین ۸۰ ٪ و ٦۰٪	بین٦۰٪ و ۱۰٪	کمتر از ۱۰٪
شیر گاو خوی	L7, L8, L12	L2, L5	L1, L4, L11, L13	-
ماست گاو خوی	-	L3, L9, L10	L6, L14	-

تحقیقات مشابه انجام شده توسط Conway و همکاران (۱۹۸۷) و Fernandez و همکاران (۲۰۰۳) برای انتخاب سویه‌های لاکتوباسیلوس مقاوم به اسید با استفاده از محتوی معده گزارش شده است. بررسی‌ها نشان دادند که بقای لاکتوباسیلوس‌ها در بافرPBS نسبت به محتوی معده، به خاطر اثر حفاظتی ترکیبات موجود در محتوی معده بر روی سلول های باکتریایی، اندکی پایین تر است. آن‌ها بافر PBS با pH مناسب را برای غربال سویه‌های باکتریایی، به منظور حفظ بقاء در شرایط *in vivo* پیشنهاد کردند [۲۷و ۲۸]. با توجه به این که تحمل محیط اسیدی معده، تنها یکی از ویژگی‌های میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌باشد و برای جلوگیری از دست رفتن سویه‌هایی با سایر خصوصیات پروبیوتیکی

مثل مقاومت بالا در برابر نمک‌های صفراوی، توانایی کلونیزاسیون به سلول‌های اپیتلیالی روده‌ای و سایر خصوصیات بیولوژیکی مفید

می‌توان انجام آزمایشات را بدون در نظر گرفتن pH آغاز نمود. زیرا می‌توان میکروارگانیسم‌های مورد نظر را با استفاده از میکروکپسولاسیون با آلژینات سدیم یا از طریق افزایش دوز مصرفی به دستگاه گوارشی رساند. در این زمینه با مطالعه‌ای که Kim و همکاران (۲۰۰٦) انجام دادند، نشان دادند که میکروکپسولاسیون با آلژینات سدیم به طور مؤثر

میکروارگانیسم را از تیمار اسیدی و دمایی در موقع انتقال به روده، بدون تأثیر منفی بر روی عملکرد پروبیوتیکی، حفاظت می‌کند [۲۹]. بعد از تعیین مقاومت به اسید، مقاومت سویه‌ها به نمک‌های صفراوی مورد بررسی قرار گرفت. کیسه صفرا یک نقش اساسی در مکانیسم دفاعی اختصاصی و غیر اختصاصی روده بازی می‌کند و شدت اثر بازدارندگی آن به وسیله غلظت نمک‌های صفراوی تعیین می‌شود. در دستگاه گوارشی انسان میانگین غلظت نمک‌های صفراوی ۰/۳ درصد وزنی/ حجمی است و برای غربال سویه‌های مقاوم به صفرا، بحرانی و کافی تلقی می‌شود. در این پژوهش این غلظت برای ارزیابی قابلیت رشد ۱۴ سویه انتخاب شده در حضور نمک‌های صفراوی انتخاب شد [۳۰]. ایجاد تأخیر در رشد سویه‌ها با نمک‌های صفراوی، در نتایج بر اساس پیشنهاد ارائه شده توسط Chateau و همکاران (۱۹۹۴) و Guo و همکاران (۲۰۰۹)، که چهار گروه متمایز را براساس تأخیر رشد ایجاد شده به وسیله نمک‌های صفراوی تشخیص داده بودند، تحلیل گردیدند: [۳۱و۳۲]

– سویه‌های مقاوم (دارای تأخیر رشدی مساوی یا کمتر از ۱۵ دقیقه)

– سویه‌هایی با تحمل بالا (تأخیر رشدی بین ۱۵ و ۴۵ دقیقه)

– سویه‌هایی با تحمل ضعیف (دارای تأخیر رشدی بین ۴۰ و ۶۰ دقیقه)

– سویه‌های حساس (تأخیر رشدی بیشتر از ۶۰ دقیقه)

۱۴ سویه منتخب، بر اساس تأخیر رشد گروه‌بندی شدند که نتایج در جدول ۳ و ۴ آورده شده است.

جدول ۳ مدت زمان رسیدن به دانسیته نوری ۰/۳ در طول موج ۶۲۰ نانومتر بر حسب ساعت

سویه‌ها	محیط کشت شاهد (MRS) (ساعت)	محیط کشت تیمار (MRS+ bile salt) (ساعت)	مدت زمان تأخیر رشد (دقیقه)
L1	۳ :۵۰	۴ :۳۵	۴۵
L2	۴ :۲۵	۴ :۳۵	۱۰
L3	۴ :۱۵	۴ :۴۰	۲۵
L4	۳ :۵۰	۴ :۲۰	۳۰
L5	۳ :۴۵	۴	۱۵
L6	۴ :۵	۵	۵۵
L7	۴ :۱۵	۴ :۲۸	۱۳
L8	۴	۴ :۱۱	۱۱
L9	۴ :۳۰	۵:۵	۳۵
L10	۳ :۴۰	۴ :۱۵	۳۵
L11	۴ :۵	۴ :۲۵	۲۰
L12	۳ :۵۵	۴ :۲۰	۲۵
L13	۳ :۱۵	۴ :۱۰	۵۵
L14	۳ :۴۰	۴ :۳۰	۵۰

جدول ۴ تعیین مقاومت به نمک‌های صفراوی

تأخیر رشد برحسب دقیقه	d≤15	15≤d≤40	40≤d≤60	d≥60
سویه‌ها	مقاوم	تحمل بالا	ضعیف	حساس
L2, L5, L7, L8	+			
L3, L4, L9, L10, L11, L12		+		
L1, L6, L13, L14			+	
-				+

* علامت + نشان دهنده اعضای گروه است.

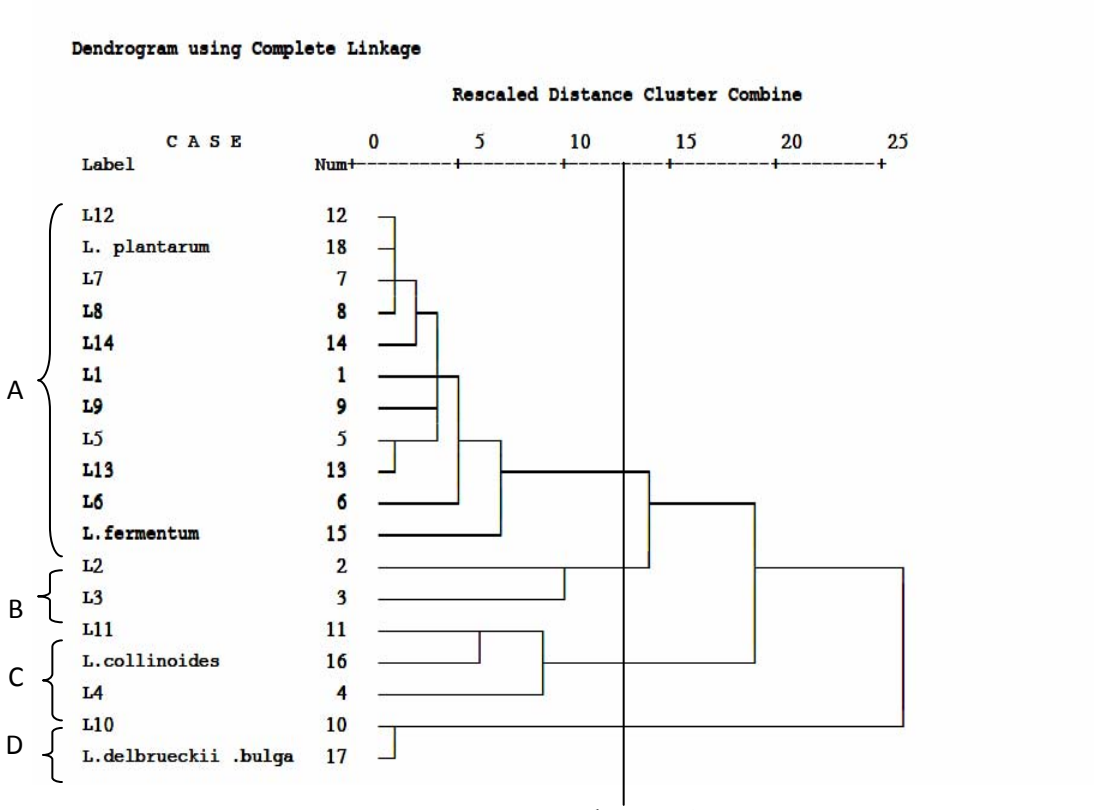
در مطالعه‌ای که Chateau و همکاران انجام دادند، تأثیر نمک‌های صفراوی بر روی رشد ۳۸ سویه لاکتوباسیلوس استفاده شده به عنوان پروبیوتیک مورد آزمایش قرار گرفت. نیمی از سویه‌های مورد آزمایش به آرامی تحت تأثیر نمک‌های صفراوی ۰/۳ درصد قرار گرفتند و تأخیر رشد زیر یک ساعت را تا رسیدن به یک جذب نوری ۰/۳ در طول موج ۶۰۰

نانومتر در محیط کشت MRS مایع در مقایسه با کشت کنترل بدون نمک‌های صفراوی به نمایش گذاشتند. یافته‌های ما در آزمایش سویه‌های انتخاب شده نسبت به نمک‌های صفراوی با یافته‌های موجود در مطالعات قبلی مطابقت داشت. در مورد همه سویه‌های آزمایش شده، تأخیر در رشد سویه‌های تیمار داده شده با نمک‌های صفراوی نسبت به کشت کنترل مشهود بود. همچنین، نوسان در میزان مقاومت در بین گونه‌های مختلف مشاهده شد [۳۱].

بعد از انتخاب باکتری‌های مقاوم به اسید و تعیین میزان تحمل آن‌ها به شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی، شناسایی مقدماتی آن‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی انجام شد. با توجه به مشخصات فنوتیپی، بیوشیمیایی و الگوی تخمیر قندی سویه های لاکتوباسیلوس (جدول ۵) و رسم دندروگرام مربوطه، لاکتوباسیلوس‌ها با برش دندروگرام از ضریب تشابه ۱۳ در چهار گروه قرار گرفتند. شکل ۲ دندروگرام حاصل برای سویه‌های لاکتوباسیلوس را براساس نتایج تست‌های بیوشیمیایی نشان می‌دهد.

جدول ۵ مشخصات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده با پتانسیل پروبیوتیکی

سویه‌ها / تست	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14
تست گرم	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
کاتالاز	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
دمای ۱۰ °C	−	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−	−	+	−
دمای ۱۵ °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
دمای ۴۵ °C	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−
نمک ۴ ٪	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
نمک ۶/۵ ٪	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−
آرابینوز	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	−	+
اینوزیتول	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
ترهالوز	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+
رافینوز	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+
رامنوز	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
ریبوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+
زایلوز	+	+	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	−
ساکارز	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+
سلوبیوز	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+
فروکتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
گالاکتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+
گلوکز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوز	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
مانوز	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+
مانیتول	−	+	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+
ملوبیوز	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+
ملوزیتوز	+	+	+	+	+	−	+	+	+	−	−	+	+	+

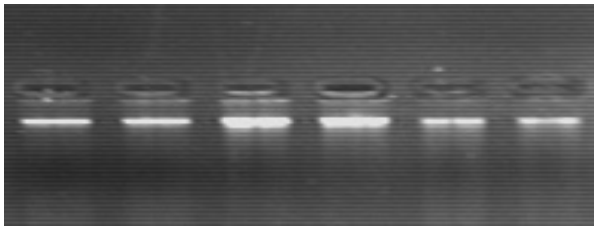


شکل۲ دندروگرام مربوط به سویه‌های لاکتوباسیلوس

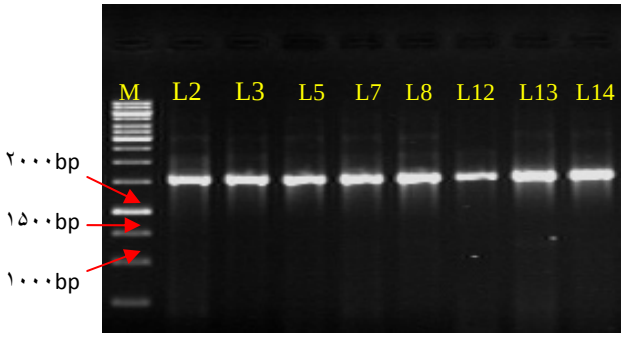
با رسم دندروگرام، سویه‌های لاکتوباسیلوس به چهار گروه A, B, C, D تقسیم‌بندی شدند. گروه A شامل ۹ سویه می‌باشد که الگوی تخمیری نزدیکی با لاکتوباسیلوس پلانتاروم[1] و لاکتوباسیلوس فرمنتوم[2] نشان دادند. سویه های L12, L8, L7 الگوی قندی کاملاً مشابهی با لاکتویاسیلوس پلانتاروم نشان دادند. مجموعه سویه‌های گروه A با ضریب تشابه ۷ درصد مشابه با لاکتوباسیلوس فرمنتوم می باشند. دو سویه L2 و L3 در گروه B قرار دارند که با ضریب تشابه ۱۰ درصد از هم جدا شدند. در گروه C سویه‌های L4 و L11 به ترتیب با ضریب تشابه ۹ و ٦ درصدبه لاکتوباسیلوس کولینودیس[3] شباهت دارند. سویه L10 در گروه D الگوی تخمیر کربوهیدراتی مشابهی با لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس[4] نشان داد. شناسایی فنوتیپی باکتری‌های لاکتیک اسید بیشتر براساس مورفولوژی سلولی و تفاوت در سوبستراهای کربوهیدراتی انجام می‌شود، اما در روش‌های شناسایی فنوتیپی عدم تکرارپذیری نتایج در همه آزمایشگاه‌ها مشکل‌ساز می باشد. زیرا علاوه بر متفاوت بودن شرایط کشت در هر آزمایشگاه، تنوع گونه‌ها نیز زیاد می‌باشد [۳۳]. بنابراین جهت شناسایی دقیق‌تر در این پژوهش از روش‌های مولکولی استفاده شد که قدرتمندترین و صحیح‌ترین روش، توالی‌یابی است [۳٤]. از بین ژن‌های مربوط به پروکاریوت‌ها، ژن 16S rRNA اغلب به عنوان یک ژن هدف در اکثر مطالعات تنوع باکتریایی مطرح می‌باشد [۱۱]. در مطالعه‌ای Fortina و همکاران (۲۰۰٦) با توالی‌یابی ژن 16S rRNA، سویه جدیدی از انتروکوکوس‌ها به نام انتروکوکوس ایتالیکوس[5] را از پنیرهای محلی ایتالیایی گزارش کردند [۳۵]. همچنین Sengun و همکاران (۲۰۰۹) از محصول تخمیری مخلوط شیره گندم و ماست، ۲۲٦ ایزوله گرم مثبت و کاتالاز منفی را جداسازی و با روش‌های مولکولی Rep-PCR و توالی‌یابی ژن 16S rRNA و پروفایل استفاده از کربوهیدرات‌ها، شناسایی نمودند [۳٦]. براساس نتایج حاصل از دندروگرام تست‌های بیوشیمیایی، ۸ سویه شامل L2, L3, L5, L7, L8, L12, L13, L14 جهت شناسایی دقیق‌تر و انجام توالی‌یابی انتخاب شدند. نتایج الکتروفورز DNA استخراج شده از لاکتوباسیلوس‌ها بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد وجود کیفیت خوب DNAها جهت استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی تأیید

1. *Lactobacillus plantarum*
2. *Lactobacillus fermentum*
3. *Lactobacillus collinoides*
4. *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*
5. *Enterococcus italicus*

نمود (شکل۳). پس از انجام PCR جهت تکثیر ژن 16S rRNA، آشکارسازی محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز انجام شد، که نتایج حاصل از آن در شکل ٤ نشان داده شده است.



شکل ۳ الکتروفورز استخراج DNA از سویه‌های جداسازی شده



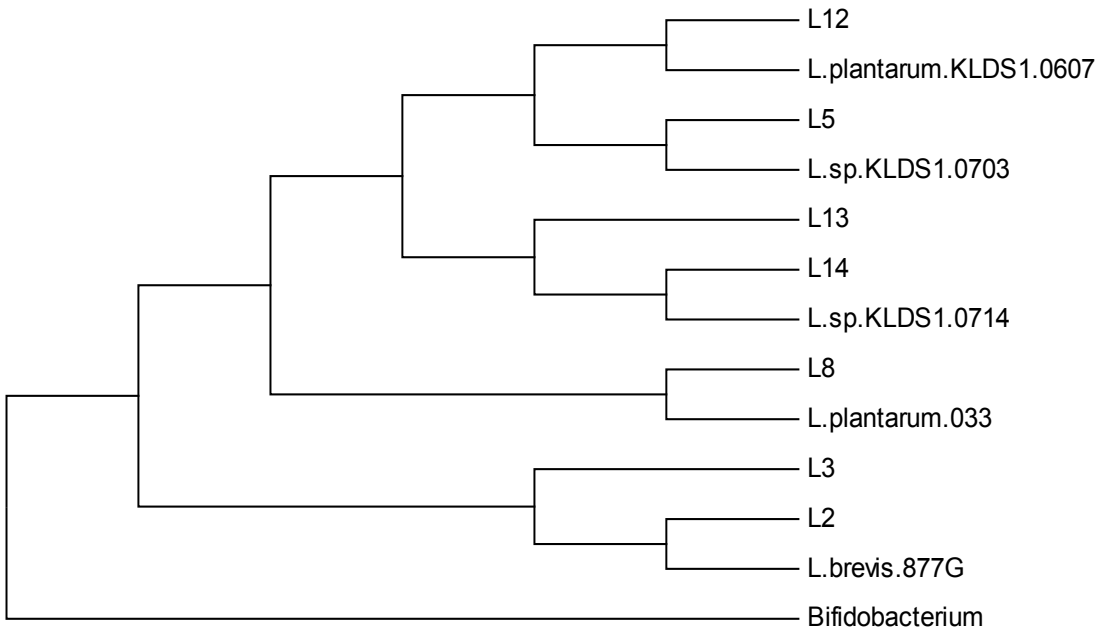
شکل ٤ الکتروفورز محصولات تکثیری توالی‌های ژن 16S rRNA برای سویه‌های جدا شده لاکتوباسیلوس

همان‌طور که در شکل ٤ مشاهده می‌شود، اندازه قطعه تکثیر شده در حدود ۱۵۰۰ جفت باز می‌باشد. پس از تأیید محصولات خالص‌سازی شده بر روی ژل آگارز، به منظور توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. توالی‌های مربوط به ژن 16S rRNA هر سویه که از تکثیر توالی‌های 16S rRNA با پرایمرهای مستقیم و معکوس حاصل شده بود، با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی Chromas و BLAST مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و هم ردیف شدند. نتایج توالی‌یابی در مورد ۷ سویه لاکتوباسیلوس شامل L2, L3, L5, L8, L12, L13, L14، حاکی از تشابه بالای ۱۰۰٪ و ۹۹٪ توالی‌های مورد نظر با توالی‌های ژن 16S rRNA ثبت شده در بانک اطلاعاتی بود. سویه L7 به دلیل نبود همپوشانی کافی دو رشته تکثیری در قسمت میانی، قابل بیان نبوده و برای بررسی‌های بیشتر نیاز به طراحی پرایمر داخل ژنی و ارسال مجدد جهت توالی‌یابی می‌باشد. این ۷ سویه در بانک جهانی NCBI در حال ثبت می‌باشند. نتایج به دست آمده در جدول ٦ آمده است.

جدول ٦ سویه‌های لاکتوباسیلوس شناسایی شده

سویه‌های جدا شده	شناسایی بر اساس توالی‌یابی ژن 16S rRNA	میزان درصد شباهت
L12	*Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0607	٪۱۰۰
L2	*Lactobacillus brevis* 877G	٪۱۰۰
L5	*Lactobacillus sp.* KLDS 1.0703	٪۹۹
L13	*Lactobacillus sp.* KLDS 1.0714	٪۱۰۰
L8	*Lactobacillus plantarum* 033	٪۱۰۰
L3	*Lactobacillus brevis* 877G	٪۹۹
L14	*Lactobacillus sp.* KLDS 1.0714	٪۱۰۰

روابط فیلوژنتیکی سویه‌های لاکتوباسیلوس شناسایی شده، با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 به صورت نمودار درختی ترسیم گردید (شکل۵). سویه‌های لاکتوباسیلوس در ٦ گروه مجزا طبقه بندی شدند. سویه‌های L2 و L3 مشابه هم و مربوط به لاکتوباسیلوس برویس بوده و سویه‌های L13 و L14 مشابه و موبوط به لاکتوباسیلوس KLDS1.0714 می‌باشند.



شکل۵ درخت فیلوژنتیکی مربوط به سویه‌های شناسایی شده از توالی‌یابی ژن 16S rRNA

۵- نتیجه‌گیری

استفاده از روش‌های فنوتیپی و تست‌های بیوشیمیایی روش خوبی برای شناسایی سویه‌ها در سطح گونه شناخته شد. به طوری که نتایج به دست آمده از یک مرحله، به ارزیابی نتایج مراحل دیگر کمک قابل توجهی نمود. همچنین روش‌های مولکولی برای شناسایی دقیق‌تر در سطح گونه انجام شد. با پیشرفت‌های صورت گرفته در سطح مولکولی، تکنیک‌های ژنوتیپی زیادی به عنوان ابزاری برای شناسایی گونه‌ها به کار می‌رود. در مقایسه با روش‌های شناسایی فنوتیپی، مزیت عمده روش‌های شناسایی براساس DNA، بالا بودن قدرت تفکیک و قابلیت اجرای آن‌ها به صورت عمومی و همچنین تکرارپذیری آن‌ها می‌باشد [۱۱]. نتایج توالی‌یابی در مورد ۷ سویه لاکتوباسیلوس جداسازی شده در این پژوهش، حاکی از تشابه کامل توالی‌های مورد نظر با توالی‌های ژن 16S rRNA ثبت شده در بانک ژنی بود که شامل زیر گونه‌هایی از سویه های لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس برویس و لاکتوباسیلوس KLDS می‌باشند و همچنین نتایج به دست آمده از توالی‌یابی با نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی کاملاً مطابقت دارد. با توجه به اینکه این سویه‌های شناسایی شده بومی دارای خواص پروبیوتیکی ازجمله مقاومت به شرایط اسیدی معده و نمک‌های صفراوی می‌باشند می‌توان از این سویه ها به عنوان استارتر در محصولات لبنی صنعتی استفاده نمود.

٦- سپاس‌گزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و نیز ریاست محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور بخاطر در اختیار قراردادن امکانات پژوهشی این تحقیق تقدیر و تشکر می گردد.

۷- منابع

[1] Ehsani, A., Mahmudi, R., Tokmechi, A. and Pajohi, M. R. 2011. Iranian white cheese as a food carrier for probiotic bacteria.Journal of Food Industry and Science.8 (31): 77-83. [inFarci]

[2] Saxelin, M., Korpela, R. and Mayra-Makinen, A. 2003. Introduction: classifying functional dairy products. In T. Mattila-Sandholm, & M. Saarela (Eds.), Functional dairy products. Boca Raton, LA, USA: CRC Press. 1-16

[3] Klaenhammer, T. R. 2000. Probiotic bacteria: today and tomorrow. Journal of Nutrition.130: 415- 416.

[4] Schrezenmeir, J. and Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics approaching a definition. Am. J. Clin. Nut. 73: 361S- 364S.

[5] Dugas, B., Mercenier, A., Lenoir-Wijnkoop, I., Arnaud, C., Dugas, N. and Postaire, E. 1999. Immunity and probiotics.Trends Immunology Today. 20(9): 387- 390.

[6]Acharya, M.R. and Shah, R.K. (2002). Selection of human isolates of bifidobacteria for their use as probiotics. Biochern Biotechnology, 102-103: 81-98.

[7] Edalatian, M. R., HabibiNajafi, M. B., Mortazavi, S. A., Nasiri, M. R.,

Basami, M. R. and Hashemi, S. M. 2012.Isolation and identification of the indigenous lactic acid bacteria from Lighvan cheese.Journal of Food Industry and Science. 9 (37): 9- 22. [inFarci]

[8] Caridi, A. 2003. Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from the artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. International Journal of Dairy Technology.56 (2): 105-110.

[9] Sreekumar, O. and Mosono, A. 2000. Lmmediated effect of lactobacillus on the intestinal flora and fecal enzyme of rats and in vitro inhibition of *E.coli* in coculture. Journal of Dairy Science, 93: 931-939.

[10] Najett, M., Ahmed, B., Akil, L., Djamila, M., Nachida, S., Fadela, Ch. and Abderrahim, Ch. 2012. Antimicrobiol activity of probiotics on Swiss Mice. Journal of Food Science and Engineering, 2: 382- 387.

[11] Durme, C., Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D. and Hallorari, S. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *In vivo* findings. Clinical Nutrition. 73(2): 386-392.

[12] Bulut, C. 2003. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese. IYTE Thesis of MS.

[13] Ghotbi, M., Soleymaniyan Zad, S. and Sheikh Zeinoddin, M. 2010. Identification of facultative hetrofermentive in Lighvan cheese. Iranian Food Science Technology. 6(2): 145-148. (in Farci)

[14] Lotfi, H., Hejazi, M.A., Maleki ZanjanI, B. and Barzegari A. 2010. Isolation, Biochemical and Molecular Identification of Potentiallly Probiotic Bacteria from Traditional Dairy Products from Heris and Sarab Regions. Journal of Food Industry Researchs. 20 (1): 1- 17. [inFarci]

[15] Hasani, M., Hesari, J., Farajnia, S and Moghadamvahed, M. 2011. Technological properties of lactobacillus species predominate in traditional cheese Lighvan. Journal of Food Industrial Researchs. 21 (4): 535- 545. [inFarci]

[16] Hejazi, M. A., Mokhtari Zunuzi, P., Khosroshahli. M., Barzegari, A., Lotfi, H. and Alizadeh, S. 2012. Molecular identification of probiotic bacteria in traditional dairy products of Azarbaijan using 16S rRNA. Journal of Agricultural Engineering Research. 13 (3): 51- 62. [inFarsi]

[17] Tafvizi, F., Tajabadi Ebrahimi, M. and Khajare, L. 2013. Molecular identification of probiotic lactobacilli in traditional food and drink Tarkhineh using 16S rRNA sequence. Food Technology and Nutrition. 10 (2): 61-68. [inFarci]

[18] Natalia, Ch. A., Patricia, B. Z., Luciana, F. F., Juliana, C. A., Izildinha, M., Ariene, G. F. and Darlila, A. G. 2013. Characterization of fresh cheese with addition of probiotics and prebiotics. Journal of Life Sciences. 7(2): 189- 195.

[19] Calicchia, M. L., Wang, C. I. E., Nomura, T., Yotsuzuka, F. and Ostato, D. W. 1993. Selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* and streptomycin resistant *Lactobacillus acidophilus* from a mixed probiotic product. Journal of Food Protection. 56:954-957.

[20] Erkkila, S. and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salts for potential probiotic use.Meat Science. 55:297-300

[21] Gilliland, S. E., Staley, T. E. and Bush, L. J. 1984. Importance of the bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. Journal Dairy Science.67: 3045-3051.

[22] Garrity, G., Boone, M., David, R. and Richard, W. 2004. Bergy's manual of systemstic bacteriology. 4th Ed. Springer pub.Mishigan.

[23] Hozapfel, W. H. and Wood, B. J. B. 1995. The general of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, Glasgow.

[24] Harrigan, W. F. and McCance, M. E. 1976. Biochemical test for bacteria laboratory method in food and dairy microbiology.Academic Press. London, New York.

[25] Cardinal, M. J., Meghrous, J., Lacroix, C. and Simard R. E. 1997. Isolation of *Lactococcuslactis* strain producing inhibitory activity against *Listeria*. Food Biotechnology.11: 129.

[26] Drake, M., Small, C.L., Spence, K.D. and Swanson, B.G. (1996). Rapid detection and identification of *Lactobacillus* sp. in dairy products by using the polymerase chain reaction. Journal of Food Protection. 59: 1031-1036

[27] Conway, P. L., Gorbach, S. L. and Goldin, B. R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells.Journal of Dairy Science.70: 1- 12.

[28] Fernandez, M. F., Boris, S. and Brbes, C. 2003. Probiotic properties of human *Lactobacilli* strains to be used in the gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology.94: 449- 455.

[29] Kim, S., Yong Cho, S., Song, O., Shin, I. S., Su Cha, D. and Park, H. 2006. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121.Food Science and Technology.41(3): 493- 500.

[30] Pennacchia, C., Ercoloni, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G. and Villani, F. 2004. Selection of *Lactobacillus* Strains from fermented sausages for their potential use as probiotics.Meat Science.67: 309- 317.

[31] Chateau, N., Deschamps, A. M. and HadjSassi, A. 1994. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. Letters in Applied Microbiology. 18: 42- 48.

[32] Guo, Zh., Wang J., Yan, L., Chen, W., Liu, X. and Zhang, H. 2009. *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. LWT- Food Science and Technology. 42: 1640- 1646.

[33] Ayele, N., Siv, A. and Goran, M. 2001. Randomaly amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles for the distinction of *Lactobacillus* species. Antonie van Leeuwenhoek. 79: 1-6.

[34] Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M. and Vernoux, J. P. 2003. Isolation, characterization and identification of *Lactobacilli*fcusng mainly on cheeses and other dairy products. Food Science and Technology.83: 269- 274.

[35] Fortina, M. G., Ricci, G., Borgo, F. and Manachini, P. L. 2006. Rapid identification of *Enterococcus italicus* by PCR with primers targeted to 16S rRNA gene. Letters in Applied Microbiology. 56:6266-8254.

[36] Sengun, I. Y., Nielsen, D., Karapinar, M. and Jakobsen, M. 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. International Journal of Food Microbiol. 135: 105- 111.

Isolation and biochemical and molecular identification of *Lactobacillus* bacteria with probiotic potential from traditional cow milk and yogurt of Khoi city

Narimani, T.[1], Tarinejad, A.[2*], Hejazi, M. A.[3]

1. MSc Student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
2. Doctor, Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
3. Post doctor, Associate Professor, Branch of North-West and West Region of Iran, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Tabriz, Iran

(Received: 91/8/16 Accepted: 92/3/8)

Probiotics are live microorganisms which when consumed in adequate amounts, can have a beneficial effect on the host. Lactic acid bacteria are the most common type that have been introduced as probiotics and are present in dairy products. The aim of this study was to isolate and identify the probiotics from microbial flora of cow milk and its traditional yogurt in Khoi area. To achieve this goal, the lactic acid bacteria were isolated by phenotypic methods (cellular morphology, colony pigmentation, Gram staining, catalase test, biochemical tests including growth in different temperatures 10°C, 15 °C and 45 °C, various concentrations 4 % and 6.5 % of salts and fermentation of 17 types of sugar) and their probiotic potential (resistant to stomach acid and bile salts) were evaluated. Then, to identify more accurately, the 16S rRNA gene of Lactobacilli were replicated with pairs of specific primers and then the purified PCR product was sent for gene sequencing. At the end, 14 strains of Lactobacilli were reported as the natural microbial flora with probiotic potential in Khoi area. These bacteria provide the good quality of the dairy products in those areas and can be used as the starter culture in industrial manufacture of dairy products.

Keywords: Probiotic, Lactobacillus, 16S rRNA gene.

*Corresponding Author E-mail Address: atarinejad@yahoo.com