جداسازی و شناسایی باکتریهای اسید لاکتیک دوغ شیر شتر تک کوهانه ایرانی و بررسی خواص تکنولوژیکی آن‌ها

نفیسه دعوتی[1*]، سعید زیبائی[2]

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی بهار، دانشگاه بوعلی سینا همدان
۲- دانشیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی واحد شمال شرق

(تاریخ دریافت: ٩٤/١٠/٠١ تاریخ پذیرش: ٩٤/١٢/٠٣)

چکیده

شیر شتر دارای فواید سلامتی و خواص شفا بخش است و باکتری‌های اسید لاکتیک نقش مهمی در کیفیت محصولات تخمیری شیر شتر نظیر دوغ بازی می‌کنند. ۳ نمونه از دوغ شیر شتر تک کوهانه ایرانی (*Camelus dromedarius*) تحت شرایط اسپتیک از استان گلستان جمع‌آوری شد. ۳۲ باکتری توسط کشت نمونه بر روی محیط کشت MRS آگار جدا شدند. در میان باکتری‌های جدا شده، از نظر فنوتیپی تنها ٤ جدایه متفاوت شامل *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس فرینتوشنسیز*، *پدیوکووس پنتوسازئوس* و *انتروکوکوس فسیوم* شناسایی شدند. جدایه‌های باکتریایی توسط تکثیر ژن١٦S rRNA به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و آنالیز محدود DNA ریبوزومی تکثیر شده (ARDRA) توسط هضم با آنزیم *Hae* III گروه بندی شدند. اما براساس آنالیز محدود ژن ١٦S rRNA، جدایه های لاکتیکی درون ٥ پروفایل باندی متفاوت گروه بندی شدند که توسط توالی‌یابی به عنوان *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس پنتوسوس*، *پدیوکووس پنتوسازئوس* و *انتروکوکوس لاکتیس* شناسایی شدند. ارزیابی فعالیت اتولیتیکی، لیپولیتیکی و تولید اسید جدایه‌ها نشان داد که پتانسیل تکنولوژیکی جدایه‌های دوغ شیر شتر ایرانی قابل توجه می‌باشد.

کلید واژگان: شتر، دوغ، باکتری‌های اسید لاکتیک، خواص تکنولوژیکی.

* مسئول مکاتبات: n.davati@basu.ac.ir

۱- مقدمه

شتر یکی از حیوانات مقاوم به مناطق خشک و بیابانی می‌باشد. و نتایج مطالعات علمی نشان داده است که شیر این حیوان دارای ارزش غذایی و خواص سلامتی بخش زیادی می‌باشد. ایران دارای مناطق بیابانی زیادی است که شتر یکی از حیوانات بومی این بیابان‌های وسیع می‌باشد. در ایران شیر شتر به صورت تازه یا به صورت تخمیری و به شکل دوغ مصرف می‌شود. در محصولات تخمیری شیر شتر، باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان آغازگر نقش مهمی در فرایند تخمیر بازی می‌کنند [۱] و یکی از مهمترین ارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌باشند. فعالیت‌های متابولیکی آن‌ها منجر به تولید مواد فرّار موثر در توسعه طعم، آروما و بافت شده و با تولید متابولیت‌های مختلف باعث افزایش زمان ماندگاری فراورده‌های لبنی می‌شوند. برخی از سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک مانیتول تولید می‌کنند که اثرات تحریک کنندگی بر سلامت انسان دارند [۲]. از دیر باز باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان مهمترین عامل رسیدن فراورده‌های لبنی، اسیدیفیکاسیون، ایجاد بافت، عطر و طعم در این فراورده‌ها شناسایی شده‌اند و باکتری‌های ذاتی هر محصول نقش اصلی را در این زمینه بازی می‌کنند. اکثر فراورده‌های لبنی تخمیری بومی هر منطقه دارای فلور میکروبی ویژه منحصر به خود می‌باشند و همین تفاوت‌ها باعث ایجاد تنوع در رایحه و طعم ویژه در فراورده‌های مختلف می‌شود البته عوامل دیگری از جمله نوع ماده اولیه، افزودنی‌ها، همچنین نحوه فرایند نیز بر خصوصیات ویژه محصول تاثیرگذار هستند. بنابراین برای حفظ خواص سنتی و ویژگی‌های ارگانولپتیکی فراورده‌های لبنی تخمیری باید سویه‌های خاص باکتری‌های اسید لاکتیک ذاتی فراورده‌های بومی هر منطقه جداسازی، شناسایی و گروه بندی شوند و قابلیت‌های عملکردی آن مورد ارزیابی قرار گیرند. در مطالعه‌ای که اعتمادی‌فر و همکاران در شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک شیر شتر استان گلستان انجام دادند موفق شدند ۵۶ جدایه انتروکوکوس با گونه-های *فسیوم*، *فکالیس*، *دورانس* و *رافینوسوس* و ۱۸ جدایه لاکتوباسیلوس با گونه‌های *فرمنتوم* و *پلانتاروم* را جداسازی کنند. در این مطالعه سهم *Enterococcus faecium* و *Lactobacillus fermentum* بیشترین بود [۳]. همچین مطالعات دیگری بر روی شناسایی فلور میکروبی فراورده‌های لبنی سنتی ایران انجام شده است نظیر شناسایی و تعیین هویت فلور لاکتیکی پنیرهای حاصل از شیر خام (لیقوان و کوزه) با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت و روش‌های مولکولی با استفاده ازتکنیک PCR-DGGE وجداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌هایی با پتانسیل پروبیوتیکی از فراورده های لبنی سنتی (ماست و پنیر) مناطق هریس و سراب [٤]. عدالتیان و همکاران در مطالعه خود توانستند باکتری‌های زیر را از پنیرهای لیقوان و کوزه جدا کنند:

Lactococcus lactis subsp. *lactis, Enterococcus faecalis, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis, Lactobacillus paracasei ssp.paracasei, Lactobacillus delbrueckii ssp. delbreuckii, Lactobacillus fructivorans, Pediococcus.pentosaceus, Enterococcus faecium, Enterococcus durans, Leuconostocs lactis, Leuconostocs mesenteroides* (۲).

در گذشته شناسایی فلور میکروبی موجود در مواد غذایی تخمیری، توسط تکنیک‌های کلاسیک وابسته به کشت انجام گرفته و در حال حاضر به وسیله روش‌های مولکولی وابسته و مستقل از کشت[1] که مکمل تکنیک‌های کشت کلاسیک هستند انجام می‌شود. این روش‌ها و تکنیک‌ها، تصویر کامل‌تری از تعداد، نوع و دینامیک ریزسازواره‌ها فراهم می‌کنند. هدف از این مطالعه جداسازی فلور لاکتیکی مسئول تخمیر شیر شتر و تولید دوغ، شناسایی فنوتیپی و مولکولی آن به روش ARDRA می-باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جداسازی و شناسایی فنوتیپی گونه‌های لاکتیکی دوغ شتر

سه نمونه دوغ شیر شتر از استان گلستان تحت شرایط سترون جمع‌آوری شد و تا رقت مناسب رقیق‌سازی گردید و بر روی محیط MRS آگار (مرک، آلمان) کشت شد. پلیت‌ها در ۲۰، ۳۷ و ٤٥ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت تحت شرایط بی-هوازی به وسیله گازپک نوع A (مرک، آلمان) گرمخانه‌گذاری

1. Culture- independent

گردیدند. سپس کلنی‌ها توسط کشت خطی بر روی محیط MRS آگار خالص‌سازی شدند. تست کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی برای غربال‌گری اولیه جدایه‌ها انجام شد. سویه‌های جدا شده از لحاظ تولید گاز، تحمل کلرید سدیم ٦,٥٪ و ١٨٪، رشد در ١٠ و ٤٥ درجه سانتی‌گراد، pH ٩,٦ و ٤,٤ pH در سطح جنس شناسایی گردیدند (٥). در جنس پدیوکوکوس، شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها در سطح گونه براساس خواص فنوتیپی جدایه‌ها به وسیله رشد در دماهای مختلف (٣٥، ٤٠، ٤٥ و ٤٨ درجه سانتی‌گراد)، در pH ٩، pH ٨، pH ٧ و pH ٤,٥، بیشترین درصد کلرید سدیم (حجمی/وزنی) مورد تحمل برای رشد علاوه بر قابلیت تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف انجام گردید. تخمیر کربوهیدرات‌ها در محیط آبی MRSبدون گلوکز با بروموکرزول پورپل ٠,٠٤ گرم در لیتر به عنوان شاخص pH، با افزودن کربوهیدرات‌های مختلف به میزان ١٪ (حجمی/وزنی)، هیدرولیز اسکولین و تولید آمونیوم از آرژنین ارزیابی شدند [٤و ٣]. جدایه‌های تایید شده از مرحله قبل در جنس انتروکوکوس براساس پروفایل تخمیر کربوهیدرات‌ها (ان-استیل‌گلوکز آمین، دی-آرابینوز، ال-آرابیتول، سلوبیوز، دولسیتول، دی-فروکتوز، گالاکتوز، بتا-جینتوبیوز، گلوکونات، دی-گلوکز، گلیسرول، گلیکوژن، اینوزیتول، ٢-کتوگلوکونات، لاکتوز، مالتوز، مانیتول، دی-مانوز، ملیبیوز، دی-رافینوز، رامنوز، سوربیتول، نشاسته، ساکروز، تری‌هالوز، گزیلیتول، دی-گزیلوز، ال-گزیلوز دی-آرابیتول، اینولین، ملی‌زیتوز، ریبوز، ال-سوربوز)، تولید استوئین، هیدرولیز اسکولین و نشاسته تا سطح گونه مورد شناسایی قرار گرفتند [٦]. همچنین جدایه‌های تایید شده در جنس لاکتوباسیلوس، براساس پروفایل تخمیر کربوهیدرات‌ها (آرابینوز، سلوبیوز، گالاکتوز، گلوکونات، لاکتوز، مالتوز، مانیتول، دی- مانوز، ملیبیوز، رافینوز، سالیسین، سوربیتول، ساکروز، تری-هالوز، گزیلوز، ملی‌زیتوز، ریبوز، اسکولین) و تولید NH3 از آرژنین تا سطح گونه مورد شناسایی قرار گرفتند [٧]. نتایج بعد از٧٢ ساعت گرمخانه‌گذاری در ٣٠°C ثبت شد [٦].

٢-٢- شناسایی مولکولی جدایه‌ها

٢-٢-١- استخراج DNA

جهت استخراج DNA، تک کلنی در ١٠٠ میکرولیتر آب دیونایز استریل تعلیق‌سازی شد. سپس ١٠٠ میکرولیتر از الکل ایزوآمیل/کلروفرم (٢٤/١) به سوسپانسیون اضافه گردید. نمونه در ١٦٠٠٠ g به مدت ٥ دقیقه در ٤ °C سانتریفوژ گردید. سپس ٢ میکرولیتر از محلول فاز آبی به عنوان منبع نمونه DNA برای واکنش PCR استفاده شد [٨].

٢-٢-٢- انجام عملیات PCR و تکثیر ناحیه ژن S ١٦rRNA

پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های 16S rDNA شامل B27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و U1492R (5′-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3′) (Bioneer, Korea) بودند. واکنش PCR به وسیله مخلوط کردن ٢ µl از DNA الگو، ١٦ µl آب دیونیزه استریل فاقد آنزیم DNAse (سیناکلون، ایران)، ١ µl از هریک از پرایمرهای B27F و U1492R (با غلظت١٠ picomole /µl) با کیت خشک 2X PCR Master (بایورون[1]، آلمان) به وسیله دستگاه ترموسایکلر با پروفایل برنامه دمایی زیر انجام گردید. مرحله فعال سازی[2] در دمای ٩٥ °C به مدت ٥ دقیقه، ٣٥ سیکل مراحل واسرشته‌سازی[3] در ٩٤ °C به مدت ٣٠ ثانیه، اتصال[4] در ٥٠ °C به مدت ٤٥ ثانیه، توسعه[5] در ٧٢ °C به مدت ٢ دقیقه، ور در نهایت مرحله توسعه نهایی[6] در ٧٢ °C به مدت ١٠ دقیقه و سرد کردن در ٤ °C به مدت ٥ دقیقه [٩].

٢-٢-٣- آنالیز محدود DNA ریبوزومی تکثیر شده (ARDRA)

جهت هضم آنزیمی به ١٠ µl محصول PCR ژن 16S rRNA از هریک از جدایه‌ها ١ µl از آنزیم محدودکننده مورد نظر (RE[7]) *Hae* III (فرمنتاز[8]، کانادا) و ٢ µl بافر آنزیم مربوطه

1. Bioron
2. Activation
3. Denaturation
4. Annealing
5. Extension
6. Final extension
7. Restriction enzyme
8. Fermentas

اضافه شد. پس از مخلوط کردن هریک از محلول‌های حاوی آنزیم در حمام بن ماری ۳۷ °C به مدت ۱/۵ ساعت قرار داده شد تا هضم انجام گردد. قطعات DNA به وسیله الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ و ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۹۰ دقیقه جدا شدند (۹).

۲-۳- بررسی فعالیت تکنولوژیکی جدایه‌ها

۲-۳-۱- ارزیابی قابلیت تولید اسید

۲-۳-۱-۱- روش پتانتیومتریک (اندازه‌گیری pH): جدایه‌ها به طور اولیه در MRS براث فعال‌سازی گردیدند و سپس به میزان ۱٪ در شیر اسکیم بازسازی شده به همراه عصاره مخمر ۰٫۳٪ و گلوکز ۰٫۲٪ کشت داده شدند و در طی گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C تغییرات pH به وسیله pH متر با الکترود شیشه‌ای (لبترون[1] PHT-110، ایران)) اندازه گیری شد[۹].

۲-۳-۱-۲- روش تیتراسیون: به دو میلی‌لیتر از نمونه، ۱ تا ۲ قطره فنل فتالئین ۱٪ به عنوان شاخص اضافه گردید. سپس نمونه‌ها با سود N ۰٫۱ تیتر شدند. زمانی‌که اولین تغییر رنگ جزئی به صورتی ظاهر شد پایان تیتراسیون ثبت شد. هر ۱ میلی-لیتر سود N۰٫۱ مصرفی معادل mg ۹٫۰۰۸ میلی‌گرم اسید لاکتیک است. سرانجام نتایج به صورت میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیان شدند [۹]. براساس نتایج حاصل از پتانتیومتریک (اندازه‌گیری pH) و تیتراسیون، نمودار میله‌ای تغییرات pH و منحنی مقدار اسید لاکتیک تولید شده برحسب میلی‌گرم در میلی لیتر در مقابل زمان توسط برنامه مایکروسافت اکسل[2] رسم گردید.

۲-۳-۲- ارزیابی فعالیت اتولیتیکی

پلت سلولی از کشت شبانه (۱۶ ساعته) توسط سانتریفوژ درg ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در ٤ °C جمع آوری شد و در بافر فسفات پتاسیم۱۰ میلی‌مولار با pH=۵٫۵ حاوی ۱مولار کلرید سدیم تعلیق سازی شده و تا OD_{620} معادل ۱ رقیق سازی گردید. سوسپانسیون سلولی در معرض یک سیکل انجماد (°C ۲۰- ، ۲٤ ساعت) و خروج از انجماد قرار گرفته سپس در°C ۳۷ گرمخانه‌گذاری شد. میزان فعالیت اتولیتیکی به صورت کاهش درصد جذب در OD_{650} نانومتر بر اساس معادله ۱ اندازه گیری شد [۱۰].

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

A_t = جذب اندازه گیری شده بعد از **t** زمان گرمخانه گذاری شده

با توجه به این معادله، جدایه‌ها از نظر اتولیز شدن براساس معیار تشریح شده آیاد و همکارانش که در بخش نتایج و بحث به آن اشاره می‌گردد درجه‌بندی شدند [۱۳-۱۱].

۲-۳-۳- ارزیابی کمی فعالیت لیپولیتیکی

جدایه‌ها در MRS براث به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ °C کشت گردیدند. سپس کشت حاصل در g ۸۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژگردید. محلول رویی برای ارزیابی کمی فعالیت لیپولیتیکی انتخاب گردید [۱٤]. فعالیت آنزیم لیپاز طبق روش یامادا و همکارانش[3] به صورت زیر 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 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 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 کردیم. 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 °C ۳۷ و بافر فسفات با pH= ۷، از سوبسترا آزاد نماید. طبق معادله ۲ فعالیت آنزیم در هر میلی لیتر محاسبه گردید [۱۵].

$$U=(N\times(V_1- V_2) \times 1000)/ t$$

U = فعالیت لیپولیتیکی [Unit/ml]؛ نرمالیته سود مصرفی جهت تیتراسیون= N؛ $V= V_1 - V_2$؛ مدت آزمایش= t.

1. Labtron
2. Microsoft Excell
3. Yamada

۳- نتایج

۳۲ باکتری توسط کشت نمونه دوغ شیر شتر بر روی محیط کشت MRS آگار جدا شدند. براساس نتایج شناسایی فنوتیپی جدایه ها در ۳ جنس پدیوکوکوس، لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس شناسایی شدند. جدایه‌های شناسایی شده در سطح این ۳ جنس، به لحاظ خصوصیات فنوتیپی در ٤ گونه متفاوت شامل *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس فرینتوشنسیز*، *پدیوکووس پنتوسازئوس* و *انتروکوکوس فسیوم* شناسایی شدند که نتایج این شناسایی فنوتیپی در سطح گونه به ترتیب برای جنس‌های لاکتوباسیلوس، پدیوکوکوس و انتروکوکوس در جداول ۲،۱ و۳ مشخص شده است. جدایه‌های باکتریایی توسط تکثیر ژن ١٦S rRNA به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و آنالیز محدود DNA ریبوزومی تکثیر شده (ARDRA) توسط هضم با آنزیم *Hae* III گروه بندی شدند.

Table 1 Phenotypic characteristics differentiating *lactobacillus* species

	Group C (Obligate heterofermentative)	
Identified isolates	*Lb. Brevis*	*Lb. Ferintoshensis*
Isolate No	7,9,10, 11,13,16,17,24	5,6, 22, 29,32
Growth at:		
15/45 (°C)	+/-	+/-
6.5% NaCl	+	+
18% NaCl	-	-
pH=4.4	-	-
pH=9.6	-	-
CO_2 production from glucose	+	+
Acid from:		
Galactose	+	+
Lactose		
Maltose	+	+
Mannitol		
D-Mannose	-	+
Melibiose	+	+
D-Raffinose	+	+
Salicin		
Sucrose	+	+
Trehalose	-	+
Arabinose	+	+
Aesculin	+	+
Melezitose	-	+
Ribose	+	+
Sorbitol		
Xylose	+	+
NH_3 production from arginine	+	+

+, 90% or more strains positive; −, 90% or more strains negative; d, 11–89% of strains positive

Table 2 Phenotypic characteristics differentiating *Pediococcus* species

Identified isolates	*P. pentosaceus*
Isolate No	1,4,8,26,30,14
Growth at:	
pH 4.5	+
pH 7.0	+
pH 8.0	+
pH 9.0	-
35°C	+
40°C	d
45°C	d
48°C	-
Acid from:	
Arabinose	+
Galactose	+
Lactose	+
Maltose	+
Melibiose	-
Ribose	+
Xylose	d
Max. NaCl conc. For growth	10

+, 90% or more strains positive; −, 90% or more strains negative; d, 11–89% of strains positive

Table 3 Phenotypic characteristics differentiating *Enterococcus* species

Identified isolates	*E. faecium*
Isolate No	2,3,12,15,18,19,20,21,23,25,27,28,31
Growth at:	
10 °C	+
45 °C	+
6.5% NaCl	+
Acid from:	
Inulin	-
Aesculin and Ribose	+
Melezitose	-
Sorbose	-
Arabinose	-
Cellobiose and Fructose	+
Dulcitol	-
Fucose	-
Galactose and Glucose	+
Glycerol and Mannitol	D
Inositol	-
Lactose and Maltose	+
D-Mannose	+
Melibiose and D-Raffinose	D
Rhamnose and Sorbitol	D
Saccharose	D
Trehalose	+
Xylose	-

+, 90% or more strains positive; −, 90% or more strains negative; d, 11–89% of strains positive

براساس آنالیز محدود ژن ١٦S rRNA توسط این آنزیم جدایه-های لاکتیکی درون ٥ پروفایل باندی متفاوت گروه بندی شدند (شکل ١). نتایج توالی‌یابی یک نماینده از هر پروفایل باندی که توسط شرکت ماکروژن کره با همولوژی ٩٨-٩٩٪ انجام گردید نشان داد که این جدایه‌ها متعلق به گونه‌های *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس پنتوسوس*، *پدیوکووس پنتوسازئوس* و *انتروکوکوس لاکتیس* می‌باشند (جدول ٤).

ارزیابی شدت اتولیز شدن باکتری‌های اسید لاکتیک براساس درصد کاهش جذب طی اتولیز شدن که توسط آیاد و همکارانش تشریح شده به صورت زیر درجه‌بندی می‌شوند [١٣-١١].

انتروکوکوس‌ها: : خوب=٣٥-٦٦،

نسبتا خوب= ٢٤-٣٤

ضعیف= ٠-٢٢

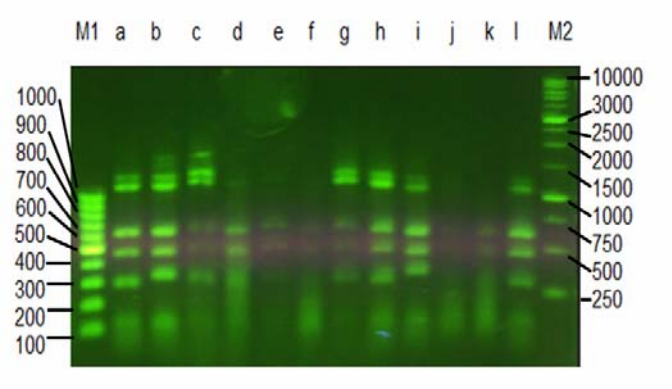

Fig 1 Amplified 16S rDNA Restriction Analysis (ARDRA) Profiles With HaeIII
M_2: 1000 bp marker **M_1**: 100bp marker **a:** *Lactobacillus brevis* **b:** *Lactobacillus fermentum.* **c:** *Lactobacillus pentosus* **d:** *Pediococcus pentosaceus* **e:** *Pediococcus pentosaceus* **f:** *Enterococcus lactis* **g:** *Lactobacillus brevis* **h:** *Lactobacillus brevis* **i:** *Pediococcus pentosaceus* **j:** *Enterococcus lactis* **k:** *Enterococcus lactis* **l**: *Pediococcus pentosaceus*

Table 4 Results of identified isolates based on 16S rDNA sequencing

Isolate No	%Identity	Closest Relative
2,3 , 12, 15, 18, 19, 20, 21, 23, 25, 27, 28, 31	98	*Enterococcus lactis*
5,6, 29,32	99	*Lactobacillus fermentum*
1,4,8,26,30,14	98	*Pediococcus pentosaceus*
11,13,16,17,24	99	*Lactobacillus brevis*
7,9,10,22	98	*Lactobacillus pentosus*

لاکتوباسیل‌ها: خوب=٧٠-٩٦، نسبتا خوب= ٤٠-٦٩ و ضعیف= ٠-٣٩

فعالیت اتولیتیکی جدایه‌های لاکتیکی دوغ شیر شتر درطی ٤٨ ساعت به صورت کاهش درصد جذب در طول موج ٦٥٠ نانومتر به صورت نمودار میله‌ای در شکل ٢ نشان داده می‌شود. بر اساس درجه بندی بالا و نمودار شکل ٢ جدایه‌های لاکتیکی شیر شتر از نظر فعالیت اتولیتیکی به صورت زیر گروه‌بندی می‌شوند:

- در سطح خوب: *پدیوکوکوس پنتوسازئوس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس برویس*.
- در سطح نسبتا خوب: *انتروکوکوس لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس پنتوسوس*

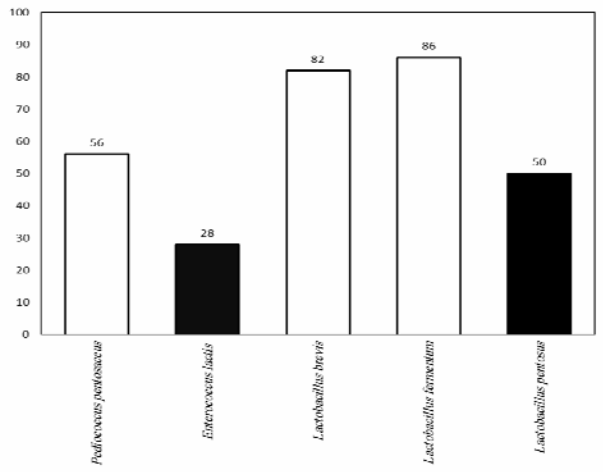

Fig 2 Autolytic activity of isolates based on absorbance reduction at 650 nm during 24 hours incubation.
fairly (black) good (white)

همچنین بر اساس نتایج بررسی فعالیت لیپولیتیکی این جدایه‌ها که در جدول ۵ نشان داده می‌شود، لاکتوباسیلوس‌ها نسبت به سایر جنس‌های دیگر دوغ شیر شتر از فعالیت لیپولیتیکی خوبی برخوردار بودند و در بین لاکتوباسیلوس‌ها به ترتیب گونه‌های *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *پنتوسوز و برویس* دارای بیشترین فعالیت لیپولیتیکی می‌باشند.

Table 5 Lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from drinking Yogurt of camel milk

Isolates	Lipolytic activity (Unit/ml)
Pediococcus pentosaceus	6,25±0.41
Enterococcus lactis	8.00±0.03
Lactobacillus pentosus	9.34±0.8
Lactobacillus brevis	9.13±0.26
Lactobacillus fermentum	12.34±0.48

نتایج کاهش pH و پتانسیل تولید اسید توسط این جدایه‌ها به ترتیب در نمودار شکل‌های ۳ و ٤ نشان داده می‌شود.

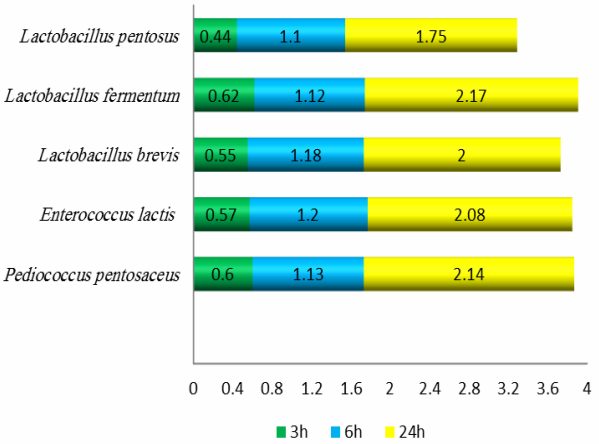

Fig 3 pH changes by isolates during 24 hours incubation

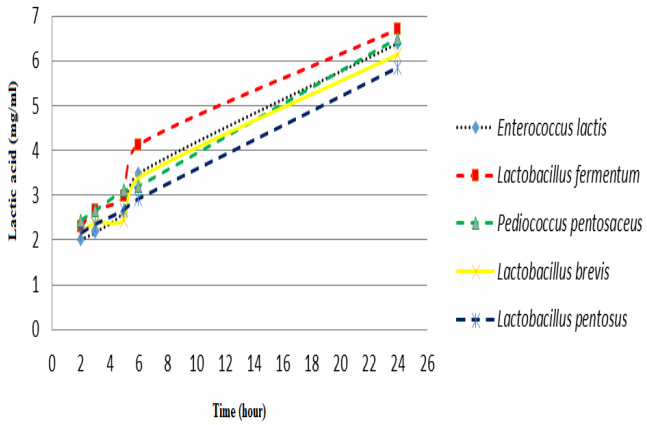

Fig 4 Lactic acid production curve by isolates

یک جدایه مناسب در تخمیر باید بتواند در دمای ۳۰°C در طی ٦ ساعت از کشت pH=٥±٠,٢ حاصل کند و یک باکتری تولید کننده سریع اسید باید به مدت ۳ ساعت از کشت اختلاف pH معادل ٠,٤ واحد (ΔpH=٠,٤ U) در دمای ۳۰°C ایجاد کند. بر اساس نمودار شکل ۳ تمام گونه‌های لاکتیکی جدا شده از دوغ شیر شتر قدرت کاهش اسید به میزان ٠,٤ واحد (ΔpH=٠,٤ U) بعد از ۳ ساعت از کشت را دارا می‌باشند. همچنین نتایج تیتراسیون اسید لاکتیک تولیدی در طی تخمیر با سود ٠,١ نرمال (شکل ٤) نشان داد که گونه‌های *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *پدیوکوکوس پنتوسازئوس و انتروکوکوس لاکتیس* بیشترین قدرت تولید اسید بر حسب میلی گرم در میلی‌لیتر اسید لاکتیک در بین سایر گونه‌ها را دارا می‌باشند و از نظر تولید اسید قدرت بالایی دارند.

٤- بحث

در آنالیز مولکولی پرایمرهای انتخاب شده قادر به تکثیر ژن ١٦rDNA هر یک از جدایه‌ها بودند. در این مطالعه روش ARDRA، غربال‌گری، گروه‌بندی و شناسایی ۳۲ جدایه حاصل از دوغ شیر شتر را تسهیل کرد. نتایج شناسایی مولکولی جدایه-های لاکتیکی بر اساس توالی‌یابی ژن١٦ rDNA که در ٥ پروفایل باندی متفاوت گروه بندی شده بودند حضور ٥ گونه متفاوت لاکتیکی شامل *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس پنتوسوس*، *پدیوکووس پنتوسازئوس و*

انتروکوکوس لاکتیس را در دوغ شیر شتر شناسایی کرد. اما با توجه به نتایج این مطالعه در غربال‌گری اولیه جامعه لاکتیکی دوغ شیر شتر در سطح جنس و گونه، و شناسایی فنوتیپی آن‌ها در بین ۳۲ جدایه لاکتیکی، ٤ گونه مختلف لاکتیکی شامل *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس فرینتوشنسیز*، *پدیوکووس پنتوسازئوس* و *انتروکوکوس فسیوم* از نظر فنوتیپی شناسایی شد. در این‌جا تفاوت‌هایی در نتایج شناسایی فنوتیپی و مولکولی مشاهده می‌شود. البته نتایج شناسایی فنوتیپی به دلایل مختلفی از دقت پایین‌تری نسبت به شناسایی مولکولی برخوردار است. مورائس و همکاران (۲۰۱۳) مطالعه‌ای جهت مقایسه دقت دو روش فنوتیپی شامل سیستم API50CHL و روش بیولوژی (شامل یک پلیت منحصر به فرد جهت تخمیر ۹٦ کربوهیدرات) با دو روش مولکولی توالی‌یابی16S rDNA و واکنش PCR مخصوص گونه[1] برای تعدادی باکتری اسید لاکتیک مشخص انجام دادند. در این مطالعه قابلیت اعتماد به دو روش مولکولی مورد استفاده ۱۰۰٪ بود و تست‌های فنوتیپی قابلیت اعتماد پایین‌تری نشان داده بطوری‌که برای دو روش بیولوژی و روش API50CHL به ترتیب ۹۹/۹ – ۷٤ و ۹۹/۹–۷۸/۲٪ گزارش شد. آن‌ها گزارش کردند برای اکثریت باکتری‌های تست شده هیچ گونه تطابقی بین نتایج فنوتیپی و مولکولی مشاهده نگردید [١٦]. روش‌های فنوتیپی دارای محدودیت‌ها و معایبی در شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک هستند نظیر قدرت پایین تمایز [١٧]، نیازهای تغذیه‌ای مشابه برای رشد، تکرارپذیری ضعیف، عدم بیان برخی ژن‌ها در برخی باکتری‌ها که مرتبط با شرایط محیطی می‌باشد، تغییرپذیری باکتری‌ها در طی رشد و تغییر شکل از حالت کروی به میله‌ای کوتاه و بالعکس [١٦]. همچنین تخمیر کربوهیدرات‌ها یک واکنش آنزیمی است که تحت تاثیر زمان و دمای گرمخانه‌گذاری قرار می‌گیرد [١٨]. در این مطالعه لاکتوباسیلوس‌ها بر اساس معیار تشریح شده توسط آیاد و همکارانش از فعالیت اتولیتیکی خوبی برخوردار بودند، مشابه این ارزیابی و نتایج در مطالعات دیگر دانشمندان بر روی باکتری‌های اسید لاکتیک نیز مشاهده می‌شود. سودا و همکاران در بررسی فعالیت اتولیتیکی سویه‌های لاکتیکی مورد مطالعه خود را به سه گروه تقسیم بندی کرد: کشت‌هایی با فعالیت اتولیتیکی بالا (۷۳٪ تا ۹٤٪) شامل *لاکتوباسیلوس رامنوسوز* FAUU110، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* زیرگونه *پاراکازئی* FAAU27، با فعالیت متوسط (٤۰٪ تا ٦۹٪) شامل *لاکتوباسیلوس رامنوسوز*FAAU23 و با فعالیت ضعیف (٤٪ تا ۳۹٪) شامل *لاکتوباسیلوس رامنوسوز* FAAU141، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* زیرگونه *پاراکازئی* FAAU92 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* FAAU20 (۱۹). در مطالعه دیگری حاساین فعالیت اتولیتیکی *لاکتوباسیلوس رامنوسوز* (DN13, DN14, DN15, DR19)، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (DR20, DN16, DN12, DR9)، *انتروکوکوس دورانس* (DN3) و *انتروکوکوس فسیوم*(DT2, DT4, DR6) را در سطح خوب گزارش کرد. که میزان این فعالیت برای *لاکتوباسیل‌ها* ۷۳٪ تا ۹۲٪ و *انتروکوکوس‌ها* ٤۰٪ تا ٥٦٪ بود. همچنین برای *لاکتوباسیلوس رامنوسوز*(DR17)، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (DT18)، *لاکتوکوکوس لاکتیس* (DT11) و *انتروکوکوس فکالیس* (DN1, DR7) سطوح متوسطی از اتولیز گزارش کرد که برای *لاکتوباسیلوس* بین ٥۷ تا ٥۸٪، *لاکتوکوکوس* ۲۲ تا ۳٦٪ و *انتروکوکوس‌ها* ۳۰ تا ۳٤٪ بود. سطوح ضعیف اتولیز در این مطالعه مربوط به سویه *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* زیرگونه *پاراکازئی* (DT21, DT23)، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (DR22)، *لاکتوکوکوس لاکتیس* (DR10) و *انتروکوکوس فکالیس* (DN5) با شدت اتولیز بین ۱۲ تا ۲۰٪ برای *لاکتوباسیلوس*، ۹٪ برای *لاکتوکوکوس* و ۸٪ برای *انتروکوکوس‌ها* گزارش شد (۱۰). در این مطالعه مشخص شد که تمام گونه‌های لاکتیکی دوغ شیر شتر دارای فعالیت لیپولیتیکی در رنج ٦,۲٥±۰,٤۱ تا ۱۲,۳٤±۰,٤۸(واحد فعالیت آنزیم لیپاز در میلی‌لیتر) می‌باشند. در حالی‌که در بررسی هاله ایجاد شده اطراف کلنی جدایه‌های لاکتیکی اومافووبه درباره جدایه‌های جنس‌های *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوکوکوس*، *لوکونوستوک*، *استرپتوکوکوس* و *انتروکوکوس* مورد مطالعه خود گزارش کرد تنها ۱۸٪ از گونه‌ها (۲۰) و آکورو درباره جدایه‌های لاکتیکی مورد مطالعه خود گزارش کرد تنها ٤٤٪ گونه‌ها فعالیت لیپولیتیکی دارند. همچنین آکورو در ارزیابی کمی فعالیت لیپولیتیکی جدایه‌ها با روش تیتراسیون گزارش کرد که *لاکتوکوکوس کرموریس* (۲۰,۰۰±٥,۰۰)، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (۱۸,۳۳±۱,٦۷)،

1. pecies specific PCR reactions

لاکتوباسیلوس کازئی (۱۶,۶۷±۴,۴۱) و *انتروکوکوس فکالیس* (۱۳,۳۳±۳,۳۳) به ترتیب فعالیت لیپولیتیکی بالایی (واحد فعالیت آنزیم در میلی‌لیتر) نشان دادند(۲۱). *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در این مطالعه نیز مشابه تحقیق ما فعالیت بالایی نشان داد. از طرفی در مقایسه با سایر مطالعات دیگر نظیر مطالعه‌ای که رای و همکارانش[1] در سال ۲۰۱۱ در مورد جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک ماهی آب شیرین انجام دادند و فعالیت لیپولیتیکی *انتروکوکوس فکالیس* و *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی* جدا شده را به ترتیب بیش از ٦ و کمتر از۵ واحد در هر میلی‌لیتر از عصاره کشت (عصاره خام آنزیمی) گزارش کردند فعالیت لیپولیتیکی جدایه پدیوکوکوسی مورد مطالعه ما (٦,٢٥±٠,٤١) بیشتر می‌باشد (١٤). همانطور که قبلا نیز اشاره شد، یک جدایه مناسب در زمینه تخمیر باید بتواند در دمای ۳۰°C در طی ٦ ساعت از کشت pH=۵±۰,۲ حاصل کند و یک باکتری تولید کننده سریع اسید باید به مدت ۳ ساعت از کشت اختلاف pH معادل ۰,٤ واحد (ΔpH=۰,٤ U) در دمای ۳۰°C ایجاد کند. 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 (۲۲). انتروکوکس‌ها اسیدیفایرهای ضعیف هستند ولی در این جنس *انتروکوکوس فکالیس* قوی تر از بقیه است و در بین استارترهای مزوفیلیک تولید کننده اسید *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *کریموریس* قوی شناخته شده است (۲۲). بنابراین بر اساس نتایج این مطالعه تمام گونه‌های لاکتیکی جدا شده از دوغ شیر شتر قدرت کاهش اسید به میزان ۰,٤ واحد (ΔpH=۰,٤ U) بعد از ۳ ساعت از کشت را دارا می‌باشند. با توجه به اینکه کاهش سریع pH در ساعات اولیه کشت یک ویژگی مطلوب برای استارترهای لاکتیکی محسوب می‌شود، جدایه‌های لاکتیکی دوغ شیر شتر در زمینه تولید اسید در سطح خوبی قرار می‌گیرند. ارزیابی فعالیت اتولیتیکی، لیپولیتیکی و تولید اسید توسط جدایه‌های لاکتیکی دوغ شیر شتر نشان داد که گونه‌های لاکتیکی جدا شده از دوغ شیر شتر ایرانی دارای پتانسیل تکنولوژیکی خوبی می‌باشند.

1. Rai

۵- منابع

[1] Etemadifar, Z., Rabbani, M., Azadbakht, E., Emami, H., and Khormali, M. 2012. Isolation and Molecular Identification of lactic acid bacteria from camel milk. 1st National Camel Congress: 16.

[2] Edalatian, M. R., Najafi, M. B. H., Mortazavi, S. A., Alegría, Á., Nassiri, M.R., and Bassami, M.R. 2012. Microbial diversity of the traditional Iranian cheeses Lighvan and Koozeh, as revealed by polyphasic culturing and culture-independent approaches. *Dairy science & technology*. 92(1): 75-90.

[3] Ahmed, T., and Kanwal, R. 2004. Biochemical characteristics of lactic acid producing bacteria and preparation of camel milk cheese by using starter culture. Pak. Vet. J. 24: 87-91.

[4] 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.

[5] Salminen S., Von Wright A., and Ouwehand A. 2004. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects: CRC Press; Marcel Dekker. 73-103.

[6] Garrity G.M., Bell J.A., and Lilburn T.G. Taxonomic outline of the prokaryotes. 2004. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer, New York, Berlin, Heidelberg. 2nd ed. Vol (3). 484-489, 517, 598-599, 626, 664-671, 673-675, 680-71.

[7] Lacerda I. C., Miranda R. L., Borelli B. M., Nunes Á. C., Nardi R., and Lachance M. A. 2005. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. International journal of food microbiology. 105(2): 213-9.

[8] Ruiz-Barba J. L., Maldonado A., and Jiménez-Díaz R. 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. Analytical biochemistry. 347(2): 333-5.

[9] Bulut Ç. 2003. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese: İzmir Institute of Technology, İzmir.

[10] 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).

[11] Ayad E. H., Verheul A., Wouters J., and Smit G. 2001. Population dynamics of lactococci from industrial, artisanal and non-dairy origins in defined strain starters for Gouda-type cheese. International Dairy Journal. 11(1): 51-61.

[12] Ayad E. H. 2001. Characterisation of lactococci isolated from natural niches and their role in flavour formation of cheese: Wageningen Universiteit.

[13] Thiboutot H., Dako E., El-Sado M., Vuillemard J., Power N., and Simard R. 1995. Influence of heat and freeze shocking on the autolysis and peptidase activities of Lactobacillus casei. Milchwissenschaft (Germany).

[14] Rai A. K, and PM H. 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(4): 1516-25.

[15] Yamada K., Ota U., and Machinda H. 1962. Studies on the Production of Lipase by Microorganisms. Part II: Quantitative Determination of Lipase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 36(10): 860-4.

[16] Moraes P. M., Perin L. M., Silva Júnior A., and Nero L. A. 2013. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. Brazilian Journal of Microbiology. 44(1): 109-12.

[17] Mohania D., Nagpal R., Kumar M., Bhardwaj A., Yadav M., and Jain S. 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. Journal of digestive Diseases. 9(4): 190-8.

[18] Ouadghiri M., Amar M., Vancanneyt M., and Swings J. 2005. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). FEMS microbiology letters. 251(2): 267-71.

[19] Soda M. E., Ahmed N., Omran N., Osman G., and Morsi A. 2003. Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheesemaking. Emirates Journal of Food and Agriculture. 15(2).

[20] Omafuvbe B. O., and Enyioha L. C. 2011. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from selected commercial Nigerian bottled yoghurt. African Journal of Food Science. 5(6): 340-8.

[21] Ukwuru M.U., and Ibeneme C.I. 2014. Biotechnological Properties of Microorganisms Isolated from Traditional Fermented Foods. Focusing on Modern Food Industry (FMFI). 3: 10-18.

[22] Durlu Ozkaya F., Xanthopoulos V., and Tunail N. 2001. Litopoulou□Tzanetaki E. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. Journal of Applied Microbiology. 91(5): 861-70.

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Drinking Yogurt of Iranian One Humped Camel milk and Evaluation of Their Technological Properties

Davati, N. [1*], Zibaee, S. [2]

1. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Bu-Ali Sina University. Hamadan, Iran.
2. Associate professor, Razi Vaccine & Serum Research Institute. Mashhad. Iran.

(Received: 2015/12/22 Accepted: 2016/02/22)

Camel milk has healing properties and health benefits. Lactic Acid Bacteria play an important role in quality of fermented products of camel milk such as Drinking Yogurt. A total of three samples of drinking yogurt of Iranian one humped camel milk (*Camelus dromedarius*) were collected from Golestan province in Iran under aseptic conditions. 32 bacteria by culturing on MRS agar medium were isolated. Among isolated bacteria, only four different isolates were phenotypically characterized that these isolates included *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus Ferintoshensis*, *Pediococcus pentosaceus* and *Enterococcus faecium.* Bacterial isolates were identified by amplification of the 16S rRNA gene by Polymerase Chain Reaction (PCR) and were then grouped by the Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) method. But, based on restriction analysis of 16S rRNA gene, the isolates were grouped into five ARDRA pattern that were identified by ribosomal DNA sequencing as *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum, Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus pentosaceus* and *Enterococcus lactis.* Evaluation of autolytic and lipolytic activity and acid production potential of isolates showed that technological potential of isolates from drinking yogurt of Iranian camel milk was remarkable.

Keywords: Camel, Drinking yogurt, Lactic Acid Bacteria, Technological Properties.

* Corresponding Author E-Mail Address: n.davati@basu.ac.ir