جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده اگزوپلی‌ساکارید از شیر و ماست گوسفندی

الهام ظفر مختاریان[۱]، محمود رضازاد باری[۲*]، صابر امیری[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، موسسه آموزش عالی صبا، ارومیه
۲- دکتری، دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
۳- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۶/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۱/۱٤)

چکیده

محصولات لبنی می‌توانند منبع غنی از انواع باکتری‌های اسید لاکتیکی با خواص کاربردی فراوان باشند که یکی از این ویژگی‌ها تولید اگزوپلی‌ساکارید است. اگزوپلی‌ساکاریدها پلیمرهایی با وزن مولکولی بالا هستند که از واحدهای قندی تشکیل شده‌اند و توسط میکروارگانیسم‌ها به محیط اطراف ترشح می‌شوند. اگزوپلی‌ساکاریدهای تولیدی قادر هستند به عنوان ماده افزودنی دارای اثرات سلامت بخشی و ویژگی بافت دهندگی مورد استفاده قرار گیرند. در این تحقیق باکتری‌های اسید لاکتیکی تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید (کلنی‌های موکوئیدی و طنابی شکل) از شیر و ماست گوسفندی تهیه شده از روستای تابعه ارومیه جداسازی و شناسایی شدند. برای این منظور، باکتری‌های اسید لاکتیک پس از کشت بر روی محیط‌های MRS جامد و M17 جامد و جداسازی بر اساس توانایی تولید اگزوپلی ساکارید جهت بررسی تنوع گونه‌ها ابتدا توسط روش‌های فنوتیپی (رنگ آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی) و سپس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) شناسایی شدند. ٤ گونه باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده گرم مثبت، کاتالاز منفی بوده و قادر به تولید بیشترین میزان اگزوپلی‌ساکارید بودند. مقادیر تولید اگزوپلی‌ساکارید باند شده و آزاد که با روش فنل- اسید سولفوریک اندازه گیری شد، به ترتیب ۰/۲± ٤۰/۲۸ تا ۰/٤۷± ٦٥/۲٦ و ۳/۲± ۱۰٥/٦۸ تا ۰/۲± ۱۳٦/۳٥ میلی گرم بر لیتر بود. ماست‌های گوسفندی که در استان آذربایجان غربی به صورت سنتی تولید می‌شوند، حاوی سویه‌هایی با ویژگی تولیدکنندگی اگزوپلی‌ساکارید هستند که می‌توانند پتانسیل کاربردی در صنعت لبنیات داشته باشند.

کلید واژگان: اگزوپلی‌ساکارید، باکتری‌های اسید لاکتیک، محصولات لبنی گوسفندی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

*مسئول مکاتبات: m.rezazadehbari@urmia.ac.ir

۱- مقدمه

باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)[1] گروه بزرگ و هتروژنی را تشکیل می‌دهند که شامل جنس‌هایی مثل لاکتوباسیلوس، انتروکوکوس، لاکتوکوکوس، لوکونوستوک، استرپتوکوکوس و غیره می‌باشند [۱]. این باکتری‌ها به عنوان آغازگر در تولید انواع محصولات لبنی تخمیری و سایر انواع محصولات تخمیری مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲].

اگزوپلی‌ساکاریدها شامل دو گروه مهم هتروپلی‌ساکارید و هموپلی‌ساکارید هستند. هتروپلی‌ساکاریدها در ساختمان خود بیش از یک نوع قند منومری دارند و در داخل سلول از قند نوکلئوتید سنتز می شوند. هموپلی‌ساکاریدها از یک قند منومری (D-گلوکز یا D- فروکتوز) تشکیل شده و در محیط خارج سلول سنتز می‌شوند [۳و٤]. هموپلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط لاکتوباسیل‌ها در دو گروه گلوکان‌ها و فروکتان‌ها طبقه‌بندی می‌گردند. هتروپلی‌ساکاریدها از انواع مختلف منوساکاریدها پدید می‌آیند و گاه در زنجیر پلی‌ساکاریدی، ترکیبات غیر کربوهیدراتی مانند سولفات‌ها و یا استات‌ها یافت می‌شوند [٤و٥]. اختلاف در نوع اگزوپلی‌ساکاریدهای مترشحه می‌تواند منشأ ایجاد بافت‌های متنوع در ماست شود [٥]. اگزوپلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط LAB جزو مواد GRAS[2] هستند [٦]. افزایش تقاضای مصرف کنندگان برای مواد غذایی تخمیری مثل ماست و پنیر دارای EPS تولیدی توسط LAB به دلیل توجه زیاد به قوام دهنده های زیستی است که منجر به تولید بیشتر پلی‌ساکاریدها شده است [۳]. EPS تولیدی توسط LAB خاصیت ژله سازی و قوام دهندگی دارند و همچنین خواص رئولوژیکی مواد غذایی را مانند افزایش گرانروی، بهبود بافت و کاهش سینرزیس بهبود می‌دهد [۷]. مطالعات پیشین نشان داده است که کاربرد گونه‌های LAB تولید کننده EPS منجر به کاهش سینرزیس و آب اندازی دلمه در ماست می‌شود زیرا EPS به لحاظ داشتن ساختار پلی-ساکاریدی و وزن مولکولی بالا باعث افزایش جذب آب شده و جدا شدن فاز سرمی از دلمه را کاهش می‌دهند [۸و۹].

ماست گوسفندی از نظر ترکیبات غنی‌تر و پر چرب‌تر از ماست گاوی است، میزان کلسیم آن دو برابر است و پروتئین بیشتری دارد. این ماست برای پخت و پز ایده‌آل است زیرا درجه حرارت‌های بالاتری را بدون تغییر در بافت تحمل می‌کند. بافت ژلی حاصل از شیر تخمیر شده مانند ماست عمدتاً مهم‌تر از خصوصیات حسی دیگر تلقی می‌شود زیرا بافت مطلوب ادراک ویژگی‌های عطر و طعم را بهبود می‌دهد [۱۰]. بافت ماست متأثر از منبع شیر و فرمولاسیون مورد استفاده، تیمار حرارتی، نوع استارتر تخمیری و شرایط تولید در مقیاس صنعتی بوده و حفظ بافت ماست و جلوگیری از آب اندازی لخته یک مسأله مهم و اساسی در کیفیت آن است. اگزوپلی ساکاریدها به دلیل قابلیت زیاد جذب آب، افزایش گرانروی محصول، به تأخیر انداختن جدایی سرم و در نتیجه کنترل آب اندازی در دوره انبارداری را در پی خواهد داشت [۱۱]. پروفایل حسی این محصول تخمیری در نواحی مختلف، بسیار متنوع است که این امر عمدتاً مربوط به میکروفلورای لاکتیکی متفاوت این محصول می‌باشد. با توجه به محبوبیت ماست بین مصرف کنندگان فرآورده‌های لبنی و با لحاظ کردن خصوصیات ارزشمند بیولوژیکی و تغذیه‌ای آن، هم چنین با توجه به خصوصیات زیست فعالی پلی ساکاریدهای مترشحه اهمیت این محصول به عنوان بستری مناسب برای کاربرد آغازگرهای تولید کننده اگزوپلی ساکارید بیش از پیش محرز می-شود. هدف این پژوهش، جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولید کننده اگزوپلی‌ساکارید از شیر، ماست و ماست گوسفندی ترش تولید شده به روش سنتی و اندازه‌گیری مقدار اگزوپلی‌ساکارید تولیدی توسط باکتری‌های جداسازی شده است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- نمونه برداری

در پژوهش حاضر نمونه‌ها، شامل شیرخام گوسفندی (M) و ماست گوسفندی (Y) و ماست ترش گوسفندی (SY)، بر اساس استاندارد ملی ماست شماره ٦٩٥ ماست دارای اسیدیته بیش از ۰/۹ گرم در هر صد گرم ماست و pH کمتر از ۳/۷ [۱۲]، از محصولات لبنی سنتی تهیه شده از روستاهای اطراف ارومیه (روستای لرنی و قصریک) و با رعایت اصول بهداشتی تهیه شد. سپس نمونه ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایش-

1. Lactic acid bacteria
2. Generally recognized as safe

های مربوطه به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه منتقل گردید.

۲-۲- جداسازی و خالص سازی سویه‌های تولید کننده اگزوپلی‌ساکارید

جهت غربالگری اولیه شناسایی بر اساس مشخصات فنوتیپ موکوئیدی انجام شد. جهت جداسازی هر کدام از نمونه‌ها، طبق استاندارد ملی ایران شماره ۹۴۱۵ ابتدا کشت میکروبی از رقت-های $۱۰^{-۵}$، $۱۰^{-۶}$، $۱۰^{-۷}$ با سه بار تکرار تهیه گردید. کشت میکروبی در شرایط بی هوازی بر روی محیط کشت‌های MRS جامد (برای جداسازی باکتری‌های میله‌ای) (Sigma-Aldrich، کشور آمریکا) و M17 جامد (برای جداسازی باکتری‌های کوکسی) (Sigma-Aldrich، کشور آمریکا) به صورت پورپلیت انجام شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سپس کلنی‌های موکوئیدی و طنابی شکل جدا شده و به محیط‌های MRS مایع و M17 مایع منتقل شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری شدند [۱۳]. سپس آزمون‌های تأییدی و بیوشیمیایی انجام گردید.

۲-۳- شناسایی جدایه ها بر اساس آنالیز توالی ژن 16s rRNA

۲-۳-۱- استخراج DNA

استخراج DNA از محیط‌های کشت MRS مایع و M17 مایع که باکتری در آنها رشد کرده و کدر شده بودند، با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک (شرکت Roche، سوئیس) انجام شد.

۲-۳-۲- انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تکثیر ژن 16s rRNA

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، پرایمرهای عمومی[3] (ماکروژن، کره جنوبی خریداری شده از شرکت تکاپو زیست، ایران) با توالی ژنوم زیر مورد استفاده قرار گرفت:

Forward: fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
Reverse: rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')

3. Universal primers

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از PCR[4] ترموسایکلر (BIOER XP CYCLER- ساخت کشور ژاپن) انجام گردید. برای این منظور ۷ µL DNA استخراج شده، ۲/۵ µL از µL/ ۱۰pmol پرایمر Forward (fd1)، ۲/۵ µL از µL/ ۱۰ pmol پرایمر reverse (rP2)، ٤ µL از $MgCl_2$ ۲۵ mm، Buffer 10x ۵ µL، dNTP Mix ۲ µL از ۱۰ mm، u Taq ۰/۲۵DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific، آمریکا) و ۲۷ µL آب مقطر مخلوط شده و به حجم ۵۰ µL رسید. برنامه دمایی شامل یک Hot short اولیه ۹٤ درجه سانتی-گراد به مدت ٤ دقیقه بود. سپس تا ۳۰ سیکل بعدی با برنامه ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۱ ثانیه (مرحله واسرشته سازی)، ٦۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (مرحله اتصال)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (مرحله توسعه) ادامه یافت و در نهایت دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه (مرحله توسعه نهایی) اعمال شد [١٤].

۲-۳-۳- تفکیک قطعات تکثیریافته با الکتروفورز

برای تفکیک قطعات تکثیر یافته PCR از الکتروفورز (Cleaver، شرکت Cleaver Scientific Ltd.، انگلستان) با ژل حاول آگاروز ۱٪ (وزنی/حجمی) حاوی رنگ اتیدیوم بروماید استفاده گردید. نمونه (۲۰ µL از محصول PCR) به همراه loading dye ۲ µL داخل چاهک ریخته شد. الکتروفورز با ولتاژ ٦۰ ولت به مدت ۳۵ دقیقه انجام شد. سپس ژل در دستگاه ژل داک[5] قرار داده شده و تشکیل باند در bp ۱۵۰۰ مورد بررسی قرار گرفت[١٤].

۲-۳-٤- توالی یابی و بیوانفورماتیک

عملیات توالی‌یابی با استفاده از پرایمرهای fd1 و rP2 و توسط شرکت ماکروژن، کره جنوبی، انجام شد. به طور متوسط bp ۸۰۰ نوکلئوتید به ازای هر توالی خوانش شده و توسط برنامه بیوانفورماتیکی بلاست[6] با توالی های موجود در بانک اطلاعاتی ژن[7] در سایت NCBI[8] مقایسه گردید. جدایه هایی با ۹۷٪

4. Polymerase chain reaction
5. Gel documentation
6. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)
7. Gen Bank
8. National Center for Biotechnology Information (http://www.NCBI.nlm.nih.gov)

مشباهتدر توالیشان به عنوان همان گونه و ۹۸٪-۹۹٪ مشابهت به عنوان همان زیر زیرگونه شناسایی شدند[۱٤].

٤-۲- آزمون‌های تاییدی و بیوشیمیایی

برای انجام آزمون های تأییدی بر روی جدایه‌های موجود، پس از انجام تست کاتالاز، رنگ آمیزی گرم و بررسی مورفولوژیک، جدایه های گرم مثبت، کاتالاز منفی و میله ای برای ادامه آزمون انتخاب شدند. سپس برای شناسایی جدایه‌ها در حد جنس، بررسی رشد در دمای C °۱۰ و C °٤٥ ، غلظت نمک ٦/٥ ٪ و pHهای ٤/٤ و ۹/٦ انجام پذیرفت [۱٥].

٥-۲- اندازه‌گیری pH

pH محیط های کشت MRS مایع و M17 مایع پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٤۸ ساعت با pH متر (CORNIN، مدل ٤۳۰، شرکت Sigma Aldrich، امریکا) اندازه گیری شد[۱٦].

٦-۲- اندازه گیری مقدار EPS تولید شده

از کلنی‌های باکتری‌هایی رشد یافته در محیط‌های MRS آگار و M17 آگار به محیط کشت MRS مایع تلقیح گردید و در شرایط بی هوازی با دمای ۳۷ درجه به مدت ٤۸ ساعت گرمخانه-گذاری شد. جهت جداسازی انواع اگزوپلی‌ساکاریدها مطابق روش آماتایاکول و همکاران (۲۰۰٦) پس از سانتریفوژ g ۱٥۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد، قسمت رسوب حاصل از سانتریفوژ حاوی EPS باند شده و قسمت رویی حاوی EPS آزاد بود. جهت جداسازی اگزوپلی‌ساکارید باند شده رسوب حاصل با ٥ میلی لیتر سرم فیزیولوژی شستشو داده شد. سپس مایع رسوبی به مدت ۱٥ دقیقه، در g۱٥۰۰۰سانتریفوژ گردید و با ٥ میلی لیتر EDTA (۰/۰٥ مولار) مخلوط شد تا سوسپانسیون تشکیل شود، سپس سوسپانسیون بدست آمده به مدت ٤ ساعت در انکوباتور شیکردار (اف جی مدل KMC 65 ، شرکت فن آزما گستر ایران) در دمای ٤ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه تحت سانتریفوژ g ٦۰۰۰ قرار داده شد. برای جداسازی اگزوپلی‌ساکارید آزاد ابتدا سوپرناتانت موجود در لوله آزمایش با ٥ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید ۲۰٪ مخلوط شد و به مدت ٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. بدین طریق مایع در لوله آزمایش دو فازه شد که به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در ادامه برای اندازه گیری اگزوپلی‌ساکاریدهای آزاد و باند شده به مایع رویی حاصل از جداسازی هر کدام به طور مجزا اتانول سرد ۹٦ درجه افزوده و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شد، تا ترسیب شود. مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد تا رسوب تشکیل شود و در محیط آزمایشگاه خشک گردید. در نهایت رسوب خشک شده با ۱۰میلی لیتر آب مقطر رقیق گردید و آزمون فنل- اسید سولفوریک مطابق روش کلوین و همکاران (۲۰۰٥) انجام گرفت. به این ترتیب که ۱ میلی لیتر نمونه با محلول ۱ میلی لیتر فنل مخلوط شد (٥٪ وزنی/حجمی) و سپس ٥ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ افزوده شد. نمونه به مدت ۳۰ دقیقه قبل از اندازه گیری جذب در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در دمای اتاق قرار گرفت و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۸٥ نانومتر جذب اندازه گیری شد. مقدار اگزوپلی ساکارید بر اساس منحنی کالیبراسیون استاندارد گلوکز محاسبه گردید. گلوکز به عنوان استاندارد برای آماده سازی منحنی کالیبراسیون (۰/۰٦۲ تا یک میلی گرم بر میلی لیتر) استفاده شد و یک میلی لیتر آب مقطر به جای محلول نمونه برای آماده سازی کنترل استفاده گردید [۱۱و۹].

۷-۲- تجزیه و تحلیل آماری

در پژوهش حاضر نمونه برداری با استفاده طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) در سطح احتمال ٥٪ و آزمون توکی برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها با استفاده از نرم افزار آماری Minitab نسخه ۱۷/۳ انجام گرفت. همچنین برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel 2016 استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۱-۳- آزمون‌های میکروبی و بیوشیمیایی

نتایج حاصل از رشد کلنی‌های نمونه های شیر خام، ماست و ماست ترش گوسفندی با سه بار تکرار در جدول (۱) نشان داده شده است.

Table 1 Number of colonies grown in MRS and M17 agar (CFU.ml^{-1})

Sample	M17 agar medium			MRS agar medium		
	Dilution 10^{-7}	Dilution 10^{-6}	Dilution 10^{-5}	Dilution 10^{-7}	Dilution 10^{-6}	Dilution 10^{-5}
M	0.3 ± 0.47	2.3 ± 1.7	4.3 ± 1.7	0	2.3 ± 1.7	4 ± 1.82
Y	1 ± 0.82	4.7 ± 2.9	9.3 ± 4.9	0.7 ± 0.94	1.3 ± 0.47	2.6 ± 2.05
SY	9.7 ± 1.25	15 ± 2.4	17.7 ± 2.05	1.7 ± 2.36	4.3 ± 1.07	3.3 ± 2.36

(M: Sheep's milk, Y: Sheep's yogurt, SY: Sheep's sour yoghurt)

نتایج حاصل از رنگ آمیزی گرم نشان داد باکتری‌های موجود در نمونه های مورد آزمایش از نوع باکتری‌های اسید لاکتیک کوکسی و گرم مثبت بودند. باکتری‌های اسید لاکتیک باکتری‌هایی گرم مثبت، کاتالاز منفی، با شکل Cocci یا Bacilli هستند که اسید لاکتیک را به عنوان محصول اصلی عمده در طول تخمیر تولید می‌کنند [۱۷ و ۱۸]. عدالتیان و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای نشان دادند که محیط MRS آگار برای باکتری‌های جنس لاکتو باسیلوس مناسب بوده و این جنس در این محیط غالب می‌باشد [۱۹]. مطابق جدول (۲) همه جدایه های میله ای شکل توانایی رشد در pH=4.4 را دارا بودند و همچنین جدایه های کوکسی شکل قادر به رشد در دمای 10^{0} c، نمک ٦/٥ ٪ و pH=4.4 را داشتند [۲۰] . تغییرات pH پس از تلقیح ۲ درصدی کلنی‌های تولید کننده اگزوپلی‌ساکارید در محیط کشت MRS مایع و M17 مایع، بعد از ٤٨ ساعت اندازه گیری گردید، pH اولیه محیط کشت MRS مایع، ٦/٢ در دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد و M17 مایع برابر ٦/٩ در همان دما بود. نتایج حاصل بعد از تلقیح کلنی‌ها در جدول (۲) درج شده است. بررسی میکروسکوپی باکتری‌های اسید لاکتیکی جداسازی شده، نشان داد سویه های جدا سازی شده غیر متحرک و گرم مثبت بودند. همچنین از نظر ویژگی‌های بیوشیمیایی، عمدتاً کاتالاز منفی و در دو مورد کاتالاز مثبت بوده و قادر به تحمل نمک طعام ٦/٥٪ بودند، در حالیکه اکثر باکتری‌های اسید لاکتیک کاتالاز منفی و گرم مثبت می‌باشند. محیط‌های کشت MRS جامد و M17 جامد به ترتیب با هدف جداسازی باکتری‌های میله ای و کوکسی استفاده شد. باکتری‌های اسید لاکتیکی در محیط MRS بهتر رشد کردند. از میان ۲۲ گونه متعلق به LAB جداسازی شده از نمونه ها، ۷ گونه دارای توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید بودند که با آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شده نیز مطابقت داشت. نکته قابل توجه این است که در شیر خام گوسفند نیز تعدادی از باکتری‌های تولید کننده اگزوپلی‌ساکارید وجود داشت و این باکتری‌ها علاوه بر محصولات تخمیری و ماست در شیر خام گوسفندی نیز یافت شدند. در واقع شیر گوسفند خود منبع غنی از LAB تولید کننده EPS می باشد و زمانی که برای تولید محصولات لبنی همچون ماست با آغازگر همراه می شود قدرت تولید کنندگی EPS افزایش می یابد و مقدار تولید EPS به طرز چشمگیری افزایش می یابد. از ۷ نوع باکتری جدا شده، *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus rhamnosus* در بعضی موارد رفتار کاتالاز مثبت و در بعضی موارد کاتالاز منفی از خود نشان داده اند که بسته به نوع ماده غذایی و محیط و شرایط کشت این خاصیت متفاوت بوده است [۲۱، ۲۲ و ۲۳].

Table 2 Biochemical characteristics of the isolated strains

Sample	pH change at M17 broth	pH change at MRS broth	Growth at pH 9.6	Growth at pH 4.4	Growth in medium with 6.5 % NaCl	Growth at 45 °C	Growth at 15 °C
M	4.8	4.6	-	+	+	+	+
Y	5.2	4.2	-	+	+	+	-
SY	5.3	4.2	-	+	+	+	-

(M: Sheep's milk, Y: Sheep's yogurt, SY: Sheep's sour yoghurt)

۲-۳- شناسایی جدایه ها با روش مولکولی

شناسایی (در حد گونه) جدایه ها یکی از مهم ترین کاربردهای آنالیز توالی ژن 16s rRNA می باشد. پس از تکثیر ژن 16s rRNA با استفاده از واکنش PCR برای DNA استخراج شده

از جدایه های مورد نظر، آمپلیکون های به دست آمده خالص سازی شده و محصول نهایی بر روی ژل آگارز برده شد. شکل (۱) نشان دهنده نتیجه الکتروفورز محصول نهایی خالص سازی شده از حاصل از تکثیر ژن 16s rRNA با استفاده از واکنش PCR می‌باشد. همانطور که مشاهده می شود طول باندهای به دست آمده در محدوده bp ۱۵۰۰ – ۱۲۰۰ قرار دارد که نشان دهنده مورد تایید بودن نتیجه شناسایی است (شکل ۱). تعیین توالی جدایه ها نشان داد که جدایه های انتخاب شده شامل چهار گونه *Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnisus, Lactobacillus buchneri* و *Lactobacillus plantarum* بودند (جدول ۳)، که با نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی مطابقت داشتند (باکتری‌هایی گرم مثبت و کاتالاز مثبت که توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید را دارا هستند).

نریمانی و همکاران درسال ۱۳۹٤، در پژوهشی در مجموع ١٤ سویه لاکتوباسیلوس به عنوان فلور میکروبی طبیعی دارای پتانسیل پروبیوتیکی جداسازی شده از شیر و ماست سنتی در منطقه خوی گزارش کردند که شامل زیر گونه هایی از سو یه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نیز بود [٢٤]. دعوتی در سال ۱۳۹٦ در پژوهشی *انتروکوکوس فاسیوم، انتروکوکوس دورانس، پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی، لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم، لاکتوباسیلوس فرینتوشنسیز، لاکتوباسیلوس جانسونی* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* را از ماست گوسفندی عشایر الوند جداسازی کرد [٢٥]. در مطالعه ای کرمنشاهی و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام دادند، *لاکتوباسیلوس بوچنری* را از ماست جداسازی کردند [٢٦].

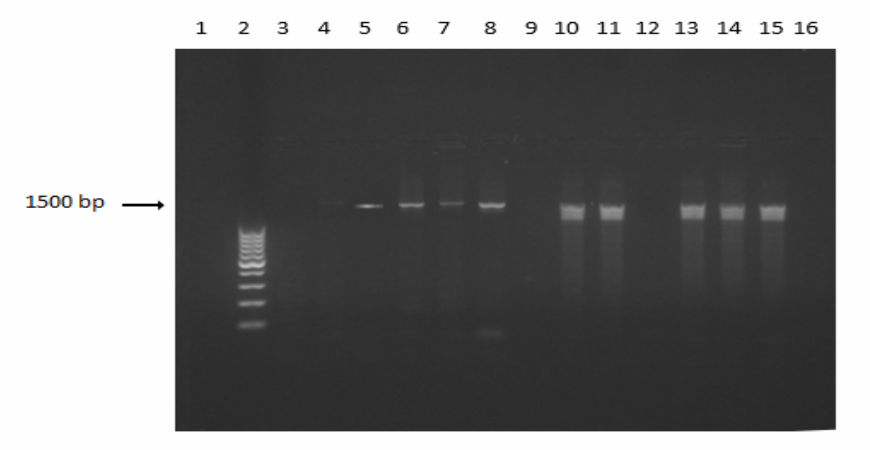

Fig 1 PCR product of 16s rRNA (1500 bp) from 4 isolates that are reproduced using universal primers (fd1 and rP2). Row 2: DNA marker 1Kb, row 4: *L. rhamnosus* M1, row 5: *L. buchneri* M3, row 6: *L. plantarum* M4, row 7: *L. casei* M2, row 8: *L. plantarum* SY1, row10: *L. casei* Y2, row 11: *L. casei* SY2, row 13: *L. rhamnosus* SY3, row 14: *L. rhamnosus* Y1 and row 15: *L. buchneri* Y3.

Table 3 Identities of pure isolates

Isolated code	Closest relative	Identity (%)
M1	*Lactobacillus rhamnosus*	99
M2	*Lactobacillus casei*	99
M3	*Lactobacillus buchneri*	99
M4	*Lactobacillus plantarum*	99
Y1	*Lactobacillus rhamnosus*	97
Y2	*Lactobacillus casei*	97
Y3	*Lactobacillus buchneri*	97
SY1	*Lactobacillus plantarum*	99
SY2	*Lactobacillus casei*	98
SY3	*Lactobacillus rhamnosus*	98

(M: Sheep's milk, Y: Sheep's yogurt, SY: Sheep's sour yoghurt)

۳-۳- میزان اگزوپلی‌ساکاریدهای تولید شده

با توجه به شکل (۲) مقادیر تولیدی اگزوپلی‌ساکارید باند شده در نمونه‌های مورد بررسی از ۰/۲ ±۴۰/۲۸ تا ۰/۴۷± ۶۵/۲۶ میلی گرم بر لیتر و مقادیر تولیدی اگزوپلی‌ساکارید آزاد در نمونه‌های مختلف از ۳/۲± ۱۰۵/۶۸ تا ۰/۲ ±۱۳۶/۳۵ میلی گرم بر لیتر بود. کمترین مقدار اگزوپلی‌ساکارید آزاد مربوط به ماست ترش و بیشترین مقدار آن مربوط به ماست بود و کمترین مقدار اگزوپلی-ساکارید باند شده مربوط به ماست ترش و بیشترین مقدار آن مربوط به شیر بود. با توجه به جدول (۲) و شکل (۲) و مقایسه داده ها می‌توان نتیجه گرفت که هر چه میزان pH در نمونه ها پایین‌تر باشد، مقدار تولید اگزوپلی‌ساکارید افزایش می‌یابد. در واقع باکتری‌های اسید لاکتیک در محیط اسیدی توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید بیشتری دارند ولی در این مورد ماست ترش از این اصل پیروی نمی‌کند و در مورد هر دو نوع اگزوپلی‌ساکارید (آزاد و باند شده) حداقل مقدار تولیدی را به خود اختصاص داده است لذا می‌توان این گونه بیان کرد که مقدار کاهش pH تا یک حدی می‌تواند با افزایش تولید اگزوپلی‌ساکارید در ارتباط باشد و چنانچه مقدار pH به کمتر ۴/۲ مقدار برسد اثر عکس خواهد داشت بطوریکه موجب کاهش مقدار اگزوپلی‌ساکارید خواهد شد. نتایج حاصل از آنالیزواریانس و مقایسه میانگین‌ها به روش توکی نشان داد که اگزوپلی ساکاریدهای باند شده در هر سه نمونه ماست مورد مطالعه با هم تفاوت معنی دار داشت ($p<۰/۰۵$). اگزوپلی‌ساکاریدهای آزاد در ماست ترش و شیر با هم اختلاف معنی دار نداشتند ($p>۰/۰۵$) ولی میزان اگزوپلی‌ساکاریدها در ماست تازه با شیر و ماست ترش اختلاف معنی داری از نظر آماری نشان داد ($p<۰/۰۵$). مقادیر اگزوپلی ساکارید باند شده تولیدی توسط جدایه‌های حاصل از شیر، ماست و ماست ترش به ترتیب ۰/۲۱ ± ۶۵/۲۶، ۰/۲۴ ± ۴۷/۵۱ و ۰/۲۴ ± ۴۰/۲۸ میلی-گرم بر لیتر و مقادیر اگزوپلی ساکارید آزاد تولید شده توسط جدایه‌های حاصل از شیر، ماست و ماست ترش به ترتیب ۰/۳۲ ± ۱۰۹/۱۹، ۰/۲۴ ± ۱۳۶/۳۵ و ۴/۰۲ ± ۱۰۵/۶۸ میلی‌گرم بر لیتر بود. در مطالعات سایر محققان مشخص شده است که شیر گوسفندی از لحاظ مقدار تولید اگزوپلی‌ساکارید تفاوت قابل ملاحظه‌ای با سایر شیرها دارد [۲۷]. نتایج بررسی های سایر محققان نشان داده است که گونه‌ها و زیر گونه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک مقادیر متفاوتی از پلی‌ساکارید در محیط شیر تولید می‌کنند. همچنین شرایط رشد از قبیل دما و زمان گرمخانه گذاری، ترکیبات مغذی محیط کشت، نسبت مایه تلقیح و pH محیط کشت بر بازده تولید اگزوپلی‌ساکاریدهای مترشحه و نوع ترکیب آن مؤثر است. به همین دلیل مقادیر اگزوپلی‌ساکارید جدا شده از محیط تخمیری از ۲۰ تا ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر متغیر است [۳و۲۸]. در این تحقیق محدوده اگزوپلی‌ساکارید تولیدی بین ۴۰ تا ۱۴۰ میلی گرم بر لیتر است که با نتایج آماتایاکول و همکاران همخوانی داشت [۹].

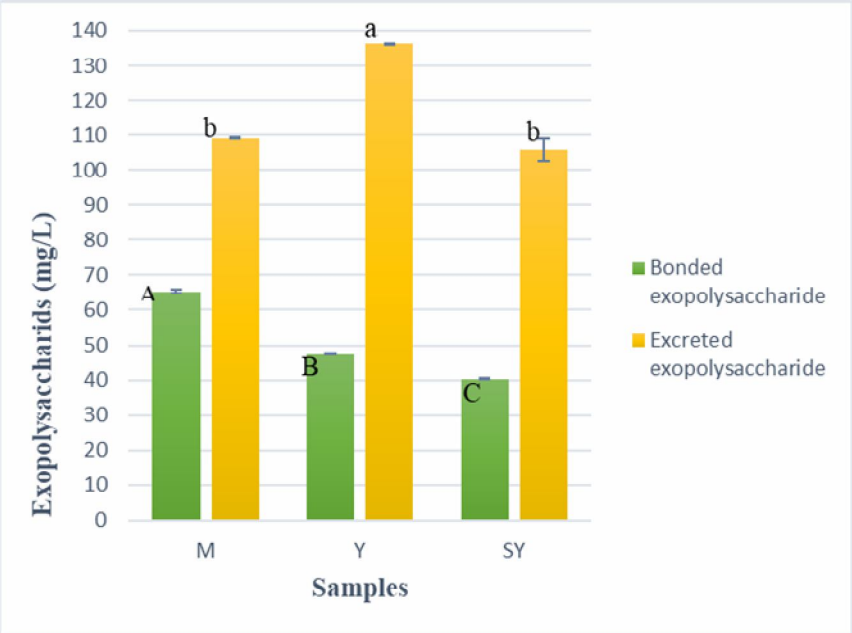

Fig 2 Bonded and excreted exopolysaccharides produced in different samples (M: Sheep's milk, Y: Sheep's yogurt, SY:Sheep's sour yoghurt)

٤- نتیجه گیری

باکتری‌های اسید لاکتیک نقش مهمی در غذاهای تخمیری لبنی دارند. تلاش برای جداسازی و شناسایی باکتری‌های جدید با خواص مطلوب بیشتر، نشان داده است که باکتری‌های اسید لاکتیک در میان تولید کنندگان EPS نقش مهمی ایفا می‌کنند. در صنایع غذایی اگزوپلی‌ساکارید میکروبی به عنوان استحکام دهنده، قوام دهنده، پایدار کننده یا امولسیفایر یا بافت دهنده بکار می‌روند. با توجه به اهمیت بافت در افزایش بازار پسندی محصولات لبنی از جمله ماست و هم چنین با توجه به گرایش مصرف کنندگان به محصولات کاملاً طبیعی اهمیت کاربرد باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده اگزوپلی‌ساکارید بیش از پیش محرز می‌شود. در پژوهش حاضر جهت غربالگری اولیه از محیط‌های کشت MRS جامد و M17 جامد استفاده شد. ۷ گونه باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده گرم مثبت، کاتالاز منفی بودند. مقادیر اگزوپلی ساکارید باند شده و آزاد تولیدی توسط جدایه‌های حاصل از شیر، ماست و ماست ترش گوسفندی به ترتیب ۰/۲۱ ± ٦٥/٢٦، ۰/٢٤ ± ٤٧/٥١ و ۰/٢٤ ± ٤٠/٢٨ میلی‌گرم بر لیتر و ۰/۳۲ ± ۱۰۹/۱۹، ۰/٢٤ ± ۱۳٦/۳٥ و ٤/۰۲ ± ۱۰٥/٦٨ میلی‌گرم بر لیتر بود. همچنین مقادیر pH در نتیجه رشد جدایه‌های مختلف با هم تفاوت داشت که همگی بر مقدار تولید اگزوپلی‌ساکارید تأثیر گذاشت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که باکتری‌های اسید لاکتیک مزوفیل جدا شده از شیر و ماست گوسفندی از پتانسیل بالایی برای تولید اگزوپلی‌ساکارید برخوردار بودند. به طور کلی علی رغم دیدگاه عمومی در رابطه با افزایش ماده خشک غیر چرب شیر و چربی برای کاهش آب اندازی، تأثیر اگزوپلی‌ساکاریدها در این زمینه بسیار حائز اهمیت است. از لحاظ صنعتی نیز می‌توان از استارترهای تولید کننده اگزوپلی‌ساکارید برای تولید ماست با ماده خشک کم و ماست کم چرب که از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه است، استفاده کرد.

٥- تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از زحمات آقایان مهندس هادی بهرامی و خانم دکتر لعیا رضازاد باری کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های دانشگاه غیر دولتی صبا ارومیه اعلام می‌دارند.

٦- منابع

[1] Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.). 2011. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. CRC Press.

[2] Cesselin, B., Derré-Bobillot, A., Fernandez, A., Lamberet, G., Lechardeur, D., Yamamoto, Y., and Gaudu, P. 2011. Responses of lactic acid bacteria to oxidative stress. *In Stress Responses of Lactic Acid Bacteria. Springer US, 24*(6): 111-127.

[3] De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F. and Degeest, B. 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal, 11*(9): 687-707.

[4] Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M. and Remaud-Siméon, M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal, 11*(9): 675-685.

[5] Baruah, R., Das, D., & Goyal, A. 2016. Heteropolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: Current Trends and Applications. *J Prob Health, 4*(141), 2.

[6] Moscovici, M. 2015. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in microbiology, 6*.

[7] Badel, S., Bernardi, T. and Michaud, P. 2011. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology advances, 29*(1): 54-66.

[8] Han, X., Yang, Z., Jing, X., Yu, P., Zhang, Y., Yi, H., & Zhang, L. 2016. Improvement of the texture of yogurt by use of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria. *BioMed research international*.

[9] Amatayakul, T., Halmos, A. L., Sherkat, F. and Shah, N. P. 2006. Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal, 16*(1): 40-51.

[10] Pereira, R., Matia-Merino, L., Jones, V. and Singh, H. 2006. Influence of fat on the perceived texture of set acid milk gels: A sensory perspective. *Food Hydrocolloids, 20*(2): 305-313.

[11] Kelvin, K, T., Haisman, D., Archer, R. and Singh, H. 2005. Evaluation and modification of existing methods for the quantification of exopolysaccharides in milk-based media. *Food Res. Int. 38*: 605-613.

[12] ISIRI. Standard No. 695, 2008, Yogurt - Features and Methods of Examination (Revision). Tehran: *Institute of Standards and Industrial Research of Iran*.

[13] ISIRI. Standard No. No. 9415, 2007, Sample Preparation Method, Primary suspensions and decimal dilutions for microbiological tests. Tehran: *Institute of Standards and Industrial Research of Iran.*

[14] Flusberg, B. A., Webster, D. R., Lee, J. H., Travers, K. J., Olivares, E. C., Clark, T. A., ... and Turner, S. W. 2010. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nature methods, 7*(6), 461-465.

[15] Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria:classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. Salminen S, von Wright A. (3th Edition). Marcel Dekker, New York, pp: 1–72.

[16] Akbari, A. Etemadi, F. Dadfama, F. Rituals, Application of General Methods of Food Microbiological Tests. Standard No. 2325. Print 5.

[17] Eiteman, M. A., & Ramalingam, S. 2015. Microbial production of lactic acid. *Biotechnology letters, 37*(5), 955-972.

[18] De Vuyst, L., & Vancanneyt, M. 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology, 24*(2), 120-127.

[19] 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]

[20] Garvie, E. I. 1986. Genus Leuconostoc. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 8th ed., Vol. 2; Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharp, M.E., Holt, J.G., Eds.; Williams and Wilkins: Baltimore pp: 1071–1075.

[21] Kraatz, M. 2011. Isolation of Lactic Acid Related Bacteria from the Pig Mucosal Proximal Gastrointestinal Tract, Including Olsenella Umbonata Sp. Nov. and Veillonella Magna Sp. Nov. Logos Verlag Berlin GmbH.

[22] Marshall, V. M., Laws, A. P., Gu, Y., Levander, F., Rådström, P., De Vuyst, L., ... and Elvin, M. 2001. Exopolysaccharide, producing strains of thermophilic lactic acid bacteria cluster into groups according to their EPS structure. *Letters in applied microbiology, 32*(6), 433-437.

[23] Grand M., Küffer M. and Baumgartner A. 2003. Quantitative analysis and molecular identification of bifidobacteria strains in probiotic milk products. *Eur. Food Res. Technol. 217*, 90–92.

[24] Narimani T., Tarinejad A. and Hejazi M. A. 2015. Isolation and biochemical and molecular identification of Lactobacillus bacteria with probiotic potential from traditional cow milk and yogurt of Khoi city. *JFST No. 48*, Vol. 12.

[25] Davati, N. 2018. Isolation and Identification of Indigenous Lactic Acid Bacteria from Traditional Yogurt Produced from Ewe's Milk from Alvand Nomads Region and Evaluation of Their Acidifying Potential. *JFST No. 74*, Vol. 15.

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

[27] Zhang, Y. U., Li, S., Zhang, C., Luo, Y., Zhang, H., & Yang, Z. 2011. Growth and exopolysaccharide production by Lactobacillus fermentum F6 in skim milk. *African Journal of Biotechnology, 10*(11), 2080-2091.

[28] Tedini, M., Sheikh Zayn al-Din, M., Takani, Sh. and Soleimanian-Zad, P. 2005. Comparison of polysaccharide content of lactic bacteria in some samples of traditional, industrial and manufactured yoghurt in the laboratory and its effect on the physical properties of the product. *Water and Soil Science (Science and Technology of Agriculture and Natural Resources): 13*(48): 207-217.

Isolation and molecular identification of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from sheep milk and yogurt

Zafar mokhtarian, E. [1], Rezazadeh Bari, M. [2*], Amiri, S. [3]

1. Graduate Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Saba Institute of Higher Education, Urmia, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
3. PhD student, Food Biotechnology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(Received: 2016/09/07 Accepted:2018/04/02)

Dairy products can be a rich source of diverse lactic acid bacteria (LAB) with high functional properties, such as exopolysaccharide (EPS) production. EPS are high molecular weight polymers that are composed of sugar units and are secreted by microorganisms into the surrounding environment. Produced EPS can be used as an additive by a health effect and texturing properties. In this study, exopolysaccharide producing LAB (ropy and mucoid colonies) were isolated and identified from raw sheep milk and sheep yogurt that made in rural areas of Urmia. For this purpose, lactic acid bacteria cultured on MRS agar and M17 agar media and then isolated on the basis of the ability to produce exopolysaccharides to study the diversity of species by phenotypic methods (Gram stain, biochemical and physiological tests) and then identified by polymerase chain reaction (PCR). The 4 strains of LAB isolated were Gram-positive as well as catalase negative and were able to produce large amounts of EPS. The amounts of bonded and abandoned exopolysaccharides which measured by phenol/sulfuric acid method, were 40.28±0.2 to 65.26±0.47 mg/L and 105.68±3.2 to 136.35±0.2 mg/L, respectively. Sheep yogurt which manufactured traditionally in West Azerbaijan province, contained exopolysaccharide producing strains that can have the potential to use in the dairy industry.

Keywords: Exopolysaccharide, Lactic acid bacteria, Sheep dairy products, Polymerase chain reaction.

* Corresponding Author E-Mail Address: m.rezazadehbari@urmia.ac.ir