



جداسازی و شناسایی *Pseudomonas protegens* از شیر خام و تحلیل مولکولی - پروتئومیکی آن در ژله‌ای شدن شیر پس چرخ استریل

- میثم صالحی سیجانی^۱، مرتضی خُمیری^۲، سودابه رستمی^۳، علیرضا صادقی ماهونک^۴، علی مویدی^۵، مجید مقدم^۵
- ۱- دانشجوی دکتری رشته علوم و صنایع غذایی - بیوتکنولوژی غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان- ایران
- ۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان- ایران
- ۳- استادیار مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان- ایران
- ۴- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان- ایران
- ۵- استاد گروه شیمی، دانشگاه اصفهان- ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

مطالعه حاضر، مکانیزم‌های مولکولی و عملکردی ژله‌ای شدن شیر استریل شده با اتوکلاو را با تمرکز بر فعالیت *Pseudomonas protegens* و سایر گونه‌های سایکروتروف بررسی کرد. شیر خام جمع‌آوری شده از دامداری‌های اصفهان از نظر حضور گونه‌های *Pseudomonas* غربالگری شد و سویه *P. protegens* KSM1 برای تحلیل دقیق انتخاب گردید. نتایج PCR نشان داد هیچ ایزوله‌ای حامل ژن *AprX* با اندازه ۸۹۰ جفت‌باز نیست و تحلیل ORF نیز تنها وجود ORF‌های کوتاه‌تر از ۱۷۱ جفت‌باز را تأیید کرد. تنوع ژنتیکی ۳۰ ایزوله با RAPD-PCR و پرایمر XD5 ارزیابی شد و ضریب شباهت ۰/۷۹ تا ۱/۰۰ و واگرایی تا ۴۳٪ به‌دست آمد؛ به‌طوری‌که *P. aeruginosa* در یک خوشه منسجم قرار گرفت، اما *P. protegens*، *P. putida koreensis* و *P. fluorescens* در شاخه‌های جداگانه توزیع شدند. بررسی SDS-PAGE نشان داد، نمونه‌های تلقیح شده تخریب شدید کازئین را تجربه کردند و وجود باند شاخص ۴۵-۵۰ کیلودالتن، بیانگر فعالیت آلکالین پروتئاز باکتریایی است. میزان پروتئولیز در نمونه‌های تلقیح شده به‌طور معنی‌داری به‌ویژه بین روزهای ۳ تا ۱۰ افزایش یافت ($p \leq 0.05$). در حالی که نمونه‌های شاهد تغییرات اندکی داشتند. این داده‌ها نشان می‌دهد پروتئازهای باکتریایی عامل اصلی تخریب پروتئین طی نگهداری هستند. در میان ایزوله‌ها، *P. protegens* KSM1 مدل مناسبی برای مطالعه مکانیسم‌های فساد پروتئینی و توسعه راهبردهای پیشگیری از ژله‌ای شدن شیر فرادما محسوب می‌شود.

تاریخ‌های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۲۳

تاریخ داوری: ۱۴۰۴/۱۰/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۹

کلمات کلیدی:

شیر فرادما،
Pseudomonas protegens
ژله‌ای شدن،
SDS PAGE
RAPD-PCR

DOI:10.48311/fsct.2026.117287.82908

* مسئول مکاتبات:

۱-مقدمه

فرآیند حرارتی فرادما با هدف افزایش قابل توجه عمر مفید شیر طراحی شده است، و شامل اعمال فرآیند حرارتی بسیار بالاعملاً بیش از ۱۳۵ درجه سانتی گراد، برای چند ثانیه، جهت غیرفعال کردن میکروارگانیسم‌های رویشی و اسپورهایی است که می‌توانند منجر به فساد شوند [1]. با وجود این فرآیند حرارتی شدید، برخی پدیده‌های فساد همچنان ثبات محصول را به چالش می‌کشند، به‌ویژه ژله‌ای شدن پروتئین که در طی زمان نگهداری، رخ می‌دهد و اغلب به عنوان «Age gelation» شناخته می‌شود [2]. ژله‌ای شدن عمدتاً ناشی از تجزیه آنزیمی کازئین‌ها است و تحت تأثیر فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک باقی‌مانده از باکتری‌های سایکروتروف است، که می‌توانند قبل یا بعد از فرآیند فرادما فعال باشند [3]. از این رو، گونه‌های سایکروتروف *Pseudomonas* از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند، که بواسطه توانایی رشد در دماهای سردخانه‌ای، می‌توانند شیر خام را در مزرعه، یا در حین حمل و نقل، فاسد کنند [4]. این باکتری‌ها پروتئازهای خارج سلولی مقاوم به حرارت ترشح می‌کنند، که بسیاری از آن‌ها فرآیند فرادما را تا حد زیادی تحمل می‌کنند [5]. آنزیم‌های پروتئولیتیک ترشح شده توسط *Pseudomonas spp.* عمدتاً کازئین‌ها شامل α ، β و κ -کازئین را هدف قرار می‌دهند و منجر به هیدرولیز آن‌ها می‌شوند و ساختار میسل کازئین را ناپایدار می‌کنند، لذا پایداری کلئیدی را کاهش می‌دهد و در نهایت تشکیل ژل را در طول زمان تسهیل می‌کند [6]. گونه‌های متنوع *Pseudomonas*، به دلیل تولید پروتئازهای نوع سربالیزین، که توسط ژن *AprX*، کد می‌شود، مورد توجه قرار گرفته است؛ *AprX* متعلق به خانواده متالوپروتئازهای وابسته به روی است. برای بررسی ارتباط بین ژنتیک میکروبی و پیامدهای عملکردی فساد، محققان تکنیک‌های تایپینگ مولکولی را با آزمون‌های فعالیت پروتئولیتیک ترکیب می‌کنند [7]. RAPD-PCR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین ایزوله‌های شیر خام استفاده می‌شود و قادر است پروفایل‌های منحصر به فرد DNA را بدون نیاز به اطلاعات قبلی از ژنوم

ایجاد کند [8]. ارتباط داده‌های مولکولی با فساد مشهود، مستلزم ارزیابی مستقیم پروتئولیز در شیر است. SDS-PAGE روشی قابل اعتماد برای مشاهده الگوهای تجزیه پروتئین است، که پروتئین‌های شیر را بر اساس وزن مولکولی در شرایط دناتوره جدا می‌کند و امکان شناسایی شکستن کازئین و تشکیل پپتیدهای کوچکتر در طول زمان را فراهم می‌سازد [9]. مقایسه پروفایل‌های SDS-PAGE شیر تلقیح شده با ایزوله‌های مشخص *Pseudomonas* با نمونه‌های کنترل تلقیح نشده و انجام آزمایش‌های ذخیره‌سازی در دماهای مختلف، هم قدرت پروتئولیتیک سویه‌های خاص و هم تأثیر عوامل محیطی بر سینتیک فساد را ارزیابی می‌کند [10]. دماهای بالاتر نگهداری، فعالیت پروتئازها را تسریع می‌کنند، در حالی که سردخانه گذاری، متابولیسم میکروبی را کند می‌کند اما فعالیت پروتئازهای مقاوم به حرارت را متوقف نمی‌کند [11]. ادغام این رویکردهای مولکولی و عملکردی، درک مکانیزم ژله‌ای شدن در شیر فرادما را فراهم می‌کند و نقش کلیدی باکتری‌های سایکروتروف در آلودگی قبل یا حین فرآیند را برجسته می‌سازد (۶). در نهایت، این رویکرد جامع، پیچیدگی فساد پس از فرآیند فرادما را نشان می‌دهد: در حالی که فرآیند فرادما، اکثر باکتری‌های زنده را می‌کشد، پروتئازهای باکتریایی می‌توانند فعال باقی بمانند. بنابراین، عمر مفید محصول تنها به بقای میکروبی وابسته نیست، بلکه به ثبات مولکولی پروتئین‌های شیر در حضور آنزیم‌های مقاوم به حرارت نیز بستگی دارد [12]. ترکیب RAPD-PCR و، بررسی هدفمند *AprX* و تحلیل پروتئولیز با SDS-PAGE چارچوبی برای ارتباط بین ژنوتیپ با فنوتیپ ایجاد می‌کند ضمن اینکه شواهد بنیادی در مورد اکولوژی میکروبی در سیستم‌های لبنی ارائه می‌کند و بنابراین مزایای عملی برای کنترل کیفیت صنعتی شیر فراهم می‌آورد [13]. این رویکرد اهمیت درک پایداری آنزیم، ژنتیک میکروبی و شیمی پروتئین را به منظور مدیریت و پیش‌بینی فساد پس از فرآوری برجسته می‌سازد. هدف از این مطالعه، شناسایی و جداسازی گونه‌های پروتئولیتیک جنس *Pseudomonas*

شناسایی و بررسی خصوصیات ژنتیکی، مورد آنالیز مولکولی قرار گرفتند.

۲-۲-۱ بررسی فعالیت پروتئولیتیک

فعالیت پروتئولیتیک از طریق ردیابی ژن *AprX* انجام گرفت و بدین منظور از ۲ پرایمر AAA TCG *sm2F* (ATA GCT TCA GCC AT) و *sm2R* (TTG AGG TTG ATC TTC TGG TT) استفاده گردید. واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از *Master Mix (Amplicon)*، مقدار ۵ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۷۵ میکرولیتر از هر پرایمر و ۶ میکرولیتر آب دیونیزه انجام گردید. برنامه چرخه حرارتی به صورت دنا تورا سیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل دنا تورا سیون در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصولات PCR با اندازه تقریبی ۸۹۰ bp روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و با استفاده از سیستم Uvidoc GAS9500 جهت شناسایی، منتقل شدند [4]. منظور اطمینان از صحت واکنش PCR، از آب دیونیزه استریل به عنوان کنترل منفی بدون DNA الگو استفاده شد. در این مطالعه کنترل مثبت در دسترس نبود، با این حال اختصاصی بودن واکنش با مشاهده باندهای با اندازه مورد انتظار (حدود ۸۹۰ جفت باز) در نمونه‌های مثبت و عدم مشاهده هرگونه باند در کنترل منفی تأیید گردید.

۲-۲-۲ تکثیر و توالی‌یابی ژن 16S rRNA

شرایط حرارتی واکنش PCR شامل یک دنا تورا سیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل شامل دنا تورا سیون در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و

از شیر خام، بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها با روش‌های مولکولی، و ارزیابی نقش پروتئازهای تولید شده توسط سویه *Pseudomonas protegens* KSM1 در ژله‌ای شدن شیر فرامدا طی دوره‌ی نگهداری بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ نمونه برداری شیر و آزمون‌های تشخیصی فنوتیپی

۲-۱-۱ جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌های شیر خام

مجموعاً ۳۰ نمونه شیر خام از دامداری‌های استان اصفهان طی هشت ماه جمع‌آوری و تحت شرایط دمایی ۴ درجه سانتیگراد، به آزمایشگاه منتقل شدند. برای آنالیز میکروبی، نمونه‌ها با استفاده از روش سریالی در محلول رینگر (Merck, Darmstadt, Germany) رقیق شدند، تا شرایط برای جداسازی و شناسایی گونه‌های پروتئولیتیک *Pseudomonas* مهیا شود.

۲-۱-۲ آزمون‌های شناسایی فنوتیپی آنالیز میکروبی

نمونه‌های رقیق شده بر روی *Cetrimide Agar (ibresco spain)* به روش گسترده، کشت داده شد، و در دمای ۴ و ۱۰ درجه سانتیگراد، به مدت حداکثر پنج روز انکوبه شدند. دو کلنی متمایز از هر پلیت انتخاب شده، بر روی بلاد آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفندی به صورت خطی کشت داده شد و سپس با رنگ‌آمیزی گرم، و آزمون‌های بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند، تا گونه‌های *Pseudomonas* تأیید اولیه شوند [14].

۲-۲ شناسایی و پروفایل ژنتیکی گونه‌های

Pseudomonas

در این مرحله، ایزوله‌های باکتریایی که بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی آزمون‌های اولیه به عنوان *Pseudomonas* تشخیص داده شده بودند، برای تأیید

برای بررسی توانایی تولید آنزیم‌های پروتئولیتیک توسط ایزوله‌های *Pseudomonas* حاصل از شیرخام و مقاومت این آنزیم‌ها در برابر فرایند حرارتی، ابتدا نمونه‌های شیر بدون چربی اسکیم به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شدند، سپس با سوسپانسیونی از ایزوله *Pseudomonas* با تراکم سلولی نهایی 10^8 CFU/ml، تلقیح شدند. نمونه‌های تلقیح شده با ایزوله *Pseudomonads*، نمونه‌های تلقیح شده و نمونه‌های کنترل بدون تلقیح ۲۴ ساعت در دمای ۴، ۱۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد، نگهداری شدند. سپس در دمای اتاق به مدت ۳، ۷ یا ۱۰ روز گرمخانه گذاری شدند. ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه با نسبت ۱:۱ با بافر بارگزاری، مخلوط شد، سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای در ۹۵ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. نمونه‌ها، به سرعت سرد و برای الکتروفورز مورد استفاده قرار گرفتند. الکتروفورز بر روی ژل‌های پلی‌آکریل آمید دوطرفه (ژل انباشته ۴ درصد و ژل جداساز ۱۲ درصد) انجام شد.، نمونه‌ها ابتدا در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت روی ژل انباشته و سپس در ولتاژ ۱۲۰ تا ۱۵۰ ولت روی ژل جداساز به مدت ۶۰ تا ۹۰ دقیقه الکتروفورز شدند. پس از اتمام الکتروفورز ژل‌ها با رنگ *Coomassie Brilliant Blue R-250* رنگ آمیزی و با محلول ۴۰ درصد متانول و ۱۰ درصد استیک اسید رنگ‌زدایی شدند. تصاویر ژل‌ها با استفاده از سیستم Uvidoc GAS9500 ثبت شد و شدت باندهای α ، β ، γ و κ - کازئین و همچنین قطعات کم‌وزن مولکولی با نرم‌افزار Gel Analyser 23.1 آنالیز گردید. نهایتاً، داده‌های مربوط به روزهای ۳، ۷ و ۱۰ نگهداری با استفاده از آنالیز یک‌طرفه (ANOVA) و به دنبال آن با آزمون‌های LSD یا Tukey، تجزیه و تحلیل شدند [17، 18].

۲-۴ تحلیل آماری و نرم‌افزارهای مورد استفاده

برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از شدت باندهای پروتئینی در آزمون SDS-PAGE، ابتدا آمار توصیفی

تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه بود، و در نهایت یک مرحله تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در این واکنش از دو پرایمر 27F (TCAGCTCGTGTCGTGAGAT) و 1492R (CGATCCGAAGTGAACAG) استفاده گردید. محصولات pcr با استفاده از پرایمر پیش‌رو در دستگاه SeqStudio Genetic Analyzer توالی‌یابی شدند و برای شناسایی گونه‌های *Pseudomonas* بر اساس اطلاعات بانک ژن پایگاه داده‌های NCBI همترازی توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل با توالی‌های موجود در این پایگاه مقایسه شدند. [15]

۲-۲-۳ پروفایل ژنتیکی با RAPD-PCR و تحلیل

خوشه‌ای

RAPD-PCR با پرایمر XD5 (5'-CTG GCG GCT G-3') در واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر MasterMix (Ampliqon, Odense, Denmark) و ۱/۵ میکرولیتر پرایمر، ۵ میکرولیتر DNA و ۶ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز، انجام شد. برنامه حرارتی شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی ۰/۸ درصد Safe Stain (Yekta Tajhiz Azma) در ۸۰ ولت به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز شدند. الگوهای باندها در BioNumerics 6.5 ثبت گردید، و شباهت‌ها با نرم افزار ClusterVis بررسی شد و درخت فیلوژنتیک با نرم افزار GelQuest ترسیم گردید [16].

۲-۳ آنالیز الگوی SDS PAGE پروتئین‌های شیر

شامل میانگین، انحراف معیار، حداقل و حداکثر محاسبه شد. جهت بررسی اثر زمان نگهداری (روزهای ۳، ۷ و ۱۰) بر میزان تخریب پروتئین در نمونه‌های تلقیح شده و تلقیح نشده، از تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده گردید. مقایسه‌های زوجی با آزمون‌های *LSD* و *Tukey HSD* به‌عنوان آزمون‌های تعقیبی انجام شد، تا گروه‌های متفاوت مشخص شوند. برای بررسی روابط فیلوژنتیک بین ایزوله‌های *Pseudomonas*، از خروجی‌های حاصل از RAPD-PCR استفاده شد. باندهای ژل در نرم‌افزار *BioNumerics (version 6.5, Applied Maths, Belgium)* ثبت و تحلیل شدند. سپس ماتریس تشابه با استفاده از شاخص *Jaccard* محاسبه گردید. خوشه‌بندی با روش *Neighbor-Joining (NJ)* در نرم‌افزار *ClusterVis* و *GelQuest* صورت گرفت، بررسی اندازه و شدت باندهای پروتئینی در تصاویر SDS-PAGE از نرم‌افزارهای *Uvidoc GAS9500* و *Gel analyser23.1* استفاده شد. تحلیل‌های آماری عددی بر روی داده‌های کمی با نرم‌افزار *SPSS Statistics (IBM Corp. USA)* ویرایش ۲۶ انجام گردید، و سطح معناداری در تمامی آزمون‌ها ($p \leq 0.05$) در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱ شناسایی گونه‌های *Pseudomonas* در شیرخام، به روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی

با توجه به پراکنش وسیع و توان بالای رشد این باکتری‌ها در شرایط سردخانه‌ای، شناسایی سریع و دقیق آن‌ها نقش مهمی در کنترل فساد و تضمین کیفیت فرآورده‌های لبنی دارد. در مرحله جداسازی، استفاده از محیط اختصاصی *Cetrimide agar* موجب حذف بسیاری از باکتری‌های غیرسودوموناس و افزایش خلوص ایزوله‌ها شد و روش کشت گسترده امکان تفکیک کلنی‌های منفرد را فراهم کرد. کلنی‌های خالص‌سازی‌شده سپس تحت مجموعه‌ای از

آزمون‌های بیوشیمیایی قرار گرفتند. نتایج این آزمون‌ها با الگوی استاندارد جنس *Pseudomonas* مطابقت کامل داشت؛ آزمون اکسیداز مثبت و کاتالاز مثبت توانایی این باکتری‌ها در متابولیسم کاملاً هوازی را نشان داد. در محیط TSI واکنش ایزوله‌ها قلیایی/قلیایی (K/K) بدون تولید گاز و فاقد H_2S بود که نشان‌دهنده عدم تخمیر قندهاست. نتایج TSI و محیط *OF Hugh-Leifson* نشان داد که ایزوله‌ها فاقد مسیرهای تخمیری بوده و انرژی خود را از مسیرهای کاملاً اکسیداتیو تأمین می‌کنند. آزمون سیترات برای تمامی ایزوله‌ها مثبت بود و آزمون‌های MR و VP نیز منفی به دست آمد که همگی با متابولیسم غیرتخمیری و اکسیداتیو سودوموناس‌ها سازگار است. همچنین رنگ‌آمیزی گرم وجود باسیل‌های گرم‌منفی باریک را نشان داد که با ساختار دیواره سلولی *Pseudomonas* مطابقت دارد [19,20]. بر اساس مشابهت کامل ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی، از میان ۳۰ ایزوله حاصل از شیر خام، ۱۱ ایزوله برای تأیید مولکولی انتخاب و توالی‌یابی شدند که نتایج آن در جدول ۱ ارائه شده است. تعداد ایزوله‌های رشد یافته در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۴ درجه سانتی‌گراد بیشتر بود که این امر توانایی بالای *Pseudomonas* را در رشد سریع‌تر در دماهای بالاتر محدوده سردخانه‌ای نشان می‌دهد و اهمیت کنترل دقیق دمای نگهداری شیر خام را برجسته می‌سازد. در مرحله مولکولی، تکثیر ژن *16S rRNA* منجر به تولید محصولاتی با اندازه تقریبی ۱۵۰۰ جفت‌باز شد. توالی‌یابی و هم‌ترازسازی این ژن امکان شناسایی گونه‌ای دقیق را فراهم کرد و مواردی که از نظر بیوشیمیایی ابهام داشتند با این روش تأیید شدند. تلفیق داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی به‌طور چشمگیری دقت و قابلیت تفکیک شناسایی را افزایش داد. در بررسی تعیین توالی، بخش‌هایی از ژن *16S rRNA* مربوط به سویه *Pseudomonas protegens* CM-44_YJ10_15-44 تحلیل شد و نتایج هم‌ترازسازی بیشترین شباهت را با گونه‌های *Pseudomonas* به‌ویژه *P. protegens* نشان داد؛ به‌طوری که E-

value صفر و میزان همپوشانی حدود ۹۷ درصد به دست آمد. این هم‌ترازی‌ها شامل توالی‌های 16S rRNA و همچنین برخی توالی‌های کل ژنوم بودند. بنابراین، توالی مورد بررسی به احتمال زیاد به گونه *P. protegens* KSM1 یا گونه‌های بسیار نزدیک به آن تعلق دارد. با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۱ یکی از گونه‌هایی که در این پژوهش در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد

از شیر خام جداسازی شد *Pseudomonas protegens* H78 به میزان ۹۷ درصد هم‌ترازی داشته است. با دو سویه CM-YJ10_15-44 و *16S rRNA* ژن بود که بر اساس اطلاعات جدول ۱، توالی مورد بررسی

Table 1. *Pseudomonas* isolates recovered from raw milk and species identification results based on *16S rRNA* gene sequencing

	Species	Strain	Query cover (%)	Sample Source (NCBI)	Gene Accession Number
1	<i>P. moravensis</i>	KR3M-28	97	Agricultural soil	MN752870.1
2	<i>P. putida</i>	M7	97	MTB-contaminated soil	KF358270.1
3	<i>P. protegens</i>	H78	99	Canola rhizosphere soil	CP013184.1
4	<i>P. koreensis</i>	N2	97	Rhizosphere	MN527329.1
5	<i>P. protegens</i>	CM-YJ10_15-44	97	Sterilized Dendrobium	MZ674076.1
6	<i>P. aeruginosa</i>	AO_15	97	Oil-contaminated soil	KX760140.1
7	<i>P. aeruginosa</i>	NBRAJG90	100	Water	EU734822.1
8	<i>Pseudomonas sp.</i>	S6-238	96	Plant tissue	JQ660196.1
9	<i>P. fluorescens</i>	16s	97	Seawater	EU543578.1
10	<i>Pseudomonas sp.</i>	KLEPS3	¹	Plant tissue	JQ910871.1
11	<i>Pseudomonas sp.</i>	1_29	-	Chemical fertilizers	MH475338.1

¹Because the portion of the sequence did not match the reference data effectively; it was not possible to provide the amount of overlap

در این مطالعه از روش مبتنی بر PCR برای بررسی ۳۰ ایزوله *Pseudomonas*، جهت شناسایی پروتئازهای قلیایی با هدف

۲-۳ بررسی حضور ژن *AprX* در ایزوله‌های شیر خام

شناسایی ژن *AprX* استفاده شد. اما هیچ یک از ایزوله‌ها باند مورد انتظار 890 bp را نشان ندادند، به منظور بررسی دقیق تر توالی محصول PCR ژن مربوط به *Pseudomonas protegens* ksm1 را با استفاده از نرم افزار *CLC genomic bench* نسخه ۸/۵ مورد تحلیل از نظر ORF قرار گرفت نتایج در جدول ۲، ارائه شده است. در زیست‌شناسی مولکولی، کدون آغازین برای شروع سنتز پروتئین ضروری است و حضور کدون صحیح، بیان درست پروتئین رمزگذاری شده را تضمین می‌کند [3]. برای اکثر گونه‌های *Pseudomonas*، کدون آغازین معمولاً ATG است که شروع ترجمه را مشخص می‌کند؛ با این حال، برخی سویه‌ها ممکن است از کدون‌های آغازین جایگزین مانند GTG یا TTG استفاده کنند که منجر به وارد شدن متیونین می‌شود [9]. در این مطالعه شناسایی ژن *AprX* در *P. protegens* KSM1 با استفاده از تحلیل ORF بررسی شد اما هیچ توالی کامل و سالمی از این ژن به طول تقریبی 890 bp یافت نشد. جدول ۲، نشان می‌دهد که قطعه DNA بررسی شده تنها شامل ORF های کوتاه است، و طولانی‌ترین مناطق پیش‌بینی شده 171 bp و

111 bp بودند و چندین ORF دیگر کمتر از 100 bp طول داشتند. جدول ۲ نشان می‌دهد که *AprX* در این داده‌ها شناسایی نشده است. چند دلیل احتمالی برای این نتیجه وجود دارد. قطعه توالی مورد بررسی ممکن است اصلاً ژن *AprX* را شامل نشده باشد زیرا این ژن در نواحی خاصی از ژنوم *Pseudomonas* قرار دارد و ممکن است در قطعه انتخابی وجود نداشته باشد، داده‌های توالی ممکن است ناقص یا بریده شده باشند و بازایی ژن کامل را ممکن نکنند و در عوض چند ORF کوتاه، تولید شود، خطاهای توالی‌یابی یا مونتاژ از جمله frameshift¹ یا کدون‌های توقف زودرس می‌توانند یک ژن پیوسته را به چند ORF کوچک تقسیم کنند [21,22]. اما در این مورد تشخیص مداوم تنها ORF های کوچک نشان می‌دهد که ژن احتمالاً در ناحیه مورد بررسی وجود ندارد. در مجموع هم توزیع تصویری ORF (نشان داده نشده است) و هم جدول داده‌ها، تأیید می‌کنند که هیچ توالی کدکننده 890 bp برای *AprX* در این قطعه DNA وجود ندارد.

Table 2. Distribution and characteristics of predicted genes in the sequence: position, length, and start codon

Sequence ID	Start Codon	Strand	Length (bp)	End (bp)	Start (bp)
Group 1	AGA	+	99	99	1
	ATG	+	27	261	235
	ATG	+	93	438	346
	ATG	+	6	579	574
	ATG	+	27	816	790
	ATG	+	18	972	955
	ATG	+	78	1050	973
	ATG	+	78	1050	973
Group 2	GAG	+	12	13	2
	ATG	+	33	124	92
	ATG	+	24	223	200
	ATG	+	87	361	275
	ATG	+	96	763	668
	ATG	+	39	949	911
Group 3	AGG	+	33	35	3
	ATG	+	15	383	369
	ATG	+	90	719	630

¹ جهش تغییر چارچوب

ATG	+	9	890	882
ATG	+	63	1049	987
AAC	—	6	1050	1045
ATG	—	72	912	841
ACT	—	171	1049	879
ATG	—	18	608	591
ATG	—	12	152	141
CTA	—	111	1048	938
ATG	—	9	841	833

Sequence 1 (Group 1) corresponds to the first region of the studied genome and includes several putative genes on the positive strand.

Sequence 2 (Group 2) represents the middle region of the genome, in which several short ORFs were identified on the positive strand.

Sequence 3 (Group 3) covers the terminal region of the genome and contains predicted genes on both the positive and negative strands, some of which have atypical start codons. Each of these sequences contains multiple putative open reading frames (ORFs), identified through gene prediction analysis using CLC Genomics Workbench version 8.5 (QIAGEN).

نشان داد، به طوری که مقادیر پایین تر بیانگر شباهت ژنتیکی زیاد و مقادیر بالاتر نشان دهنده ی واگرایی تکاملی قابل توجه بودند. ایزوله های *P. aeruginosa* در یک خوشه ی متراکم قرار گرفتند که معرف قرابت ژنتیکی بالا و احتمال منشأ یا شرایط زیست محیطی مشترک است. در مقابل، *P. putida* و *P. fluorescens* در شاخه هایی مجزا و با فاصله ی ژنتیکی بالا از گروه مذکور تفکیک شدند. گونه های لاین ۴ *P. protegens* و لاین ۶ و لاین ۷ *P. koreensis* در یک زیرخوشه ی مشترک قرار گرفتند که بیانگر قرابت فیلوژنتیکی و احتمال هم پوشانی عملکرد متابولیکی است. در حالی که *P. moraviensis* (لاین ۱۲ و ۱۳)، در شاخه ای مستقل با بیشترین تمایز ژنتیکی مشاهده گردید (شکل ۳). ماتریس شباهت محاسبه شده برای ۳۰ ایزوله، ضرایب بینو ۰.۷۹ تا ۱.۰۰ را نشان داد که معرف هم گونی تاکسونومیکی بالا در میان جمعیت مورد مطالعه است. مطالعات مختلف نشان داده اند که RAPD توان تفکیک بالایی میان ایزوله های مختلف *P. aeruginosa* دارد و می تواند به عنوان شاخصی برای شناسایی تنوع ژنتیکی و اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد. در پژوهش Campell و همکاران (۲۰۰۰)، ۱۳۱ تیپ ژنتیکی مجزا در میان ۲۰۰ ایزوله از *P. aeruginosa* شناسایی شد، که نشان دهنده ی توان بالای RAPD در تفکیک درون گونه ای

۳-۳ بررسی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی

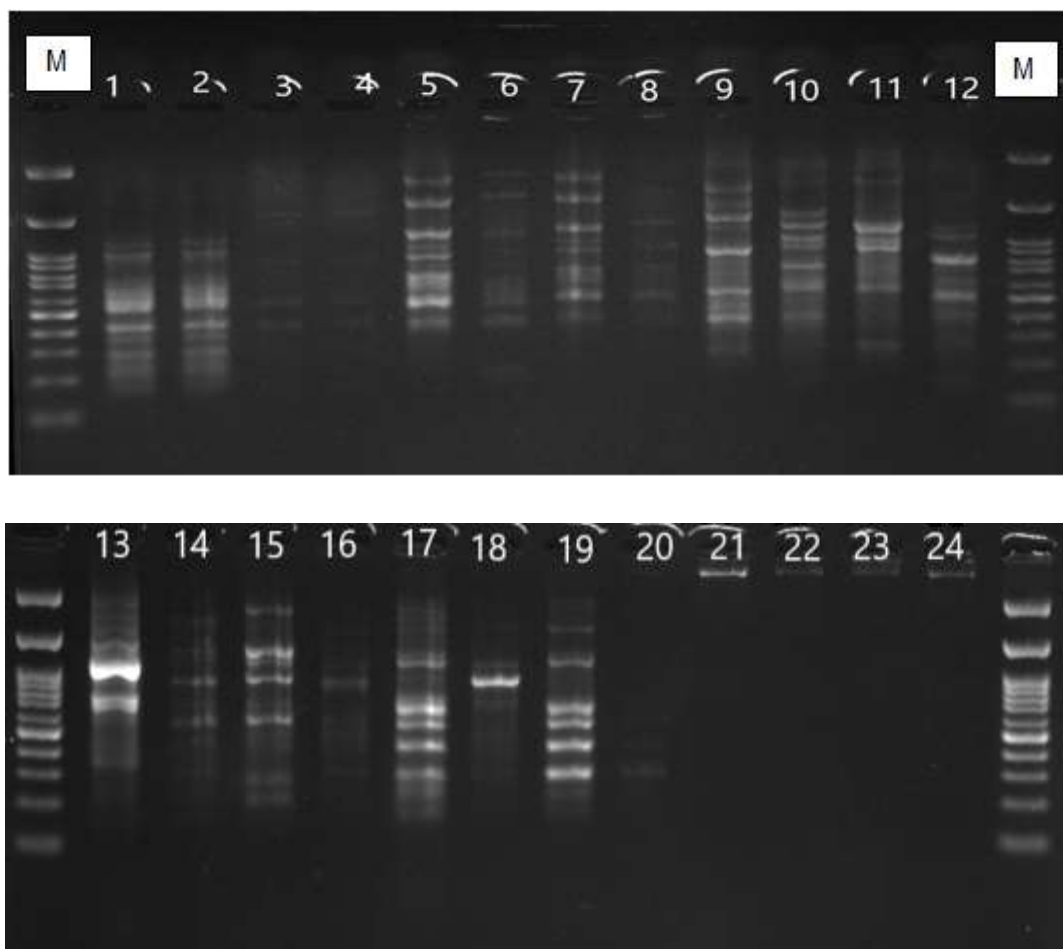
ایزوله های باکتریایی جنس *Pseudomonas* با استفاده

از روش RAPD PCR

در این پژوهش برای بررسی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی میان ایزوله های باکتریایی جنس *Pseudomonas* از دو روش مکمل RAPD PCR و توالی یابی ژن 16srRNA استفاده شد. محصولات مربوط به RAPD PCR ۳۰ ایزوله بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی ۰/۸ درصد رنگ آشکارساز در ۸۰ ولت به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به داده های هم تراز شده توالی ژن ها و اطلاعات جدول ۱ و نیز تحلیل توالی ها و شباهت های الگوی قطعات ژنی روی ژل با نرم افزار ClusterVis نشان داد که لاین ۹ و ۱۰، متعلق به *P. putida* بوده است، لاین ۱۵، ۱۷، ۱۸ و ۱۹ متعلق به *P. fluorescens* است. *P. aeruginosa*، لاین های ۴ و ۶ را به خود اختصاص داده است. *P. moraviensis* لاین ۱۲ و ۱۳، *P. koreensis* لاین ۷ و *Pseudomonas sp* لاین ۳ و ۲۰ را در برداشته است (شکل ۲). درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر الگوهای RAPD اختلاف ژنتیکی ایزوله ها را در دامنه ۰/۹ تا ۴۳

ژنتیکی مانند REP-PCR و BOX-PCR از نظر سهولت اجرا، سرعت، و توان تفکیک درون گونه‌ای نتایج مطلوبی را نشان داد. در مجموع، این یافته‌ها بیانگر آن است که روش RAPD با وجود سادگی و هزینه‌ی پایین، ابزاری مؤثر برای بررسی تنوع ژنتیکی، تمایز سویه‌ها و شناسایی روابط فیلوژنتیکی درون و بین گونه‌های مختلف *Pseudomonas* محسوب می‌شود [23-25].

بود [23]. به‌طور مشابه، Hemmatzadeh & Haghkhal (۲۰۲۱) با به‌کارگیری RAPD و ERIC-PCR، گزارش کردند که RAPD قادر به شناسایی تمایزاتی در میان ایزوله‌هایی بود که توسط روش ERIC-PCR غیرقابل تفکیک بودند، که این امر دقت بالاتر RAPD را در برخی موارد نشان می‌دهد [24]. همچنین در مطالعه‌ی Abdel-Rhman و Rizk (۲۰۲۰) گزارش دادند که، روش RAPD در مقایسه با سایر روش‌های



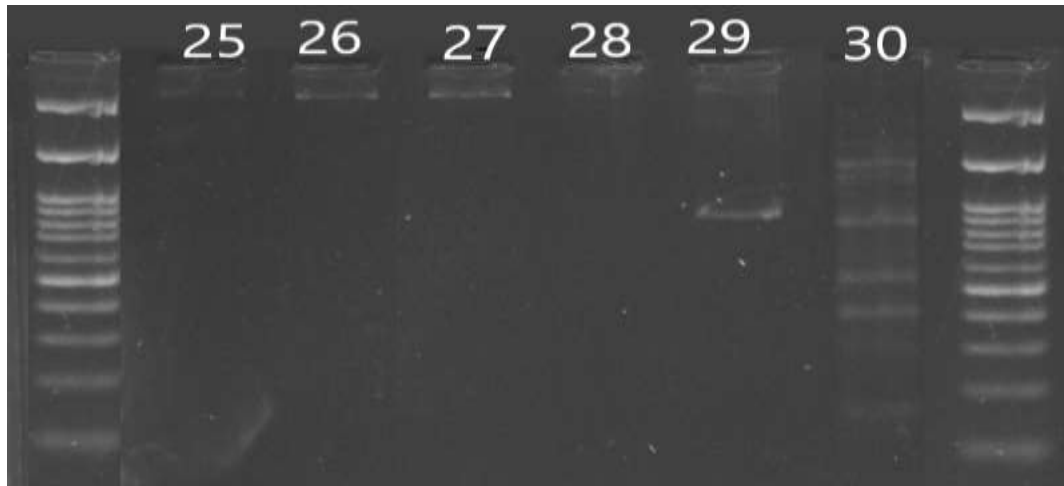


Fig 1. RAPD pattern of the XD5 gene fragment amplified by PCR in 30 *Pseudomonas* species.
M: 100 bp DNA ladder (molecular size standard); Lanes 1–30: XD5 gene fragments from the 30 *Pseudomonas* isolates in this study.

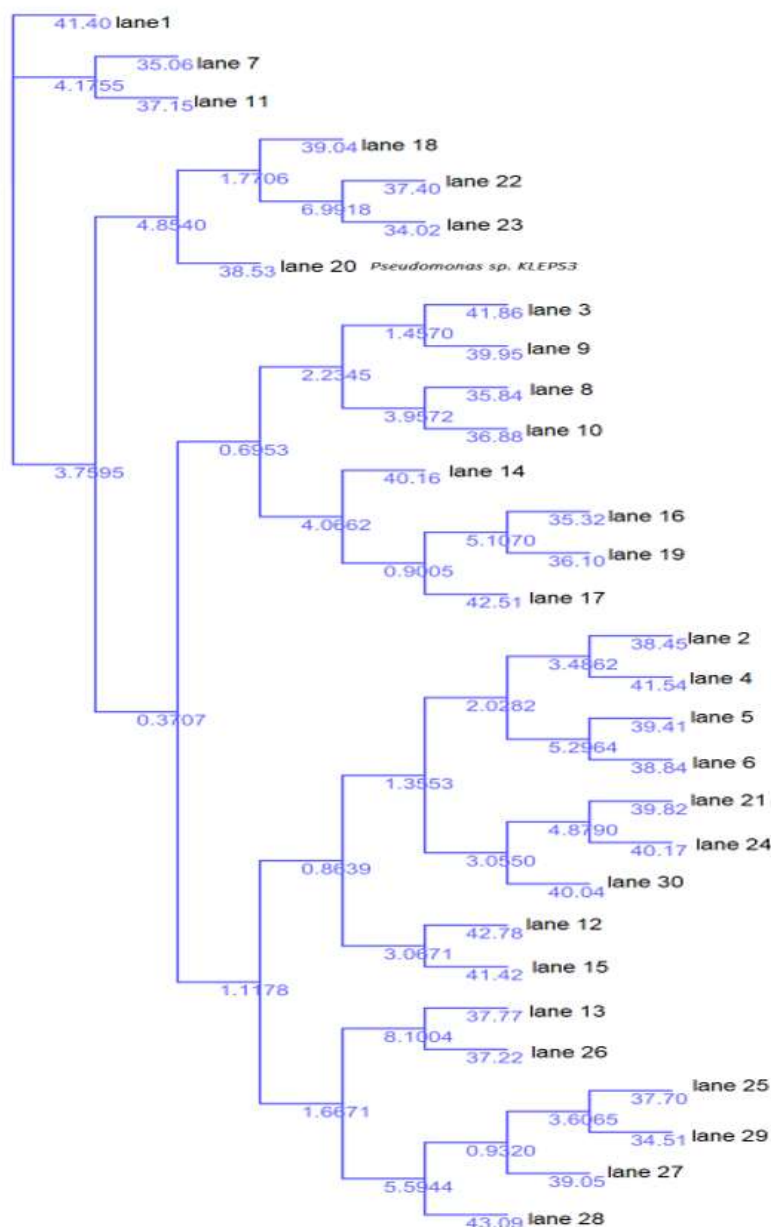


Fig 2. RAPD-PCR-based phylogenetic tree with bootstrap values and genetic distances for analyzing evolutionary relationships among 30 *Pseudomonas* isolates

نوارهای α -، β - و κ -casein نشان می‌دهند. بیانگر آن است که افزایش زمان نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و حضور پروتئازهای باکتریایی باعث تشدید پروتئولیز شده است. باند شاخص ۵۰-۴۵ کیلودالتن در گروه‌های A، B و C وجود داشته و نشان‌دهنده فعالیت آلکالین پروتئاز باکتریایی است [7, 14, 26]. در حالی که در گروه‌های بدون تلقیح، باندهای ۵۰-۴۵ کیلودالتن ضعیف بوده و عمدتاً منشأ طبیعی داشته و مربوط به فعالیت

۳- ۴ الگوی الکتروفورزی SDS-PAGE در شیر پس چرخ تلقیح شده با *Pseudomonas protegens* KSM-1

الگوی الکتروفورز SDS-PAGE در شکل ۳ نشان می‌دهد که نمونه‌های تلقیح شده A، B، C نسبت به نمونه‌های بدون تلقیح D، E، F تخریب بسیار بیشتری را در

C است و در روزهای ۷ و ۱۰ smear گسترده و باندهای کم وزن مولکولی ۱۰-۲۰ کیلوالتن تشدید شده است، در حالی که گروه‌های D، E و F الگوی پایدارتر و تخریب بسیار محدودتری نشان می‌دهند.

آنزیم‌های میکروبی نیست و عمدتاً مربوط به پروتئین‌های طبیعی شیر (BSA, lactoferrin, IgG) یا قطعات ناشی از حرارت بالا (۱۱۰ درجه سانتیگراد در ۱۰ دقیقه) است [27]. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، شدت تخریب در گروه A بسیار بیشتر از گروه‌های B و

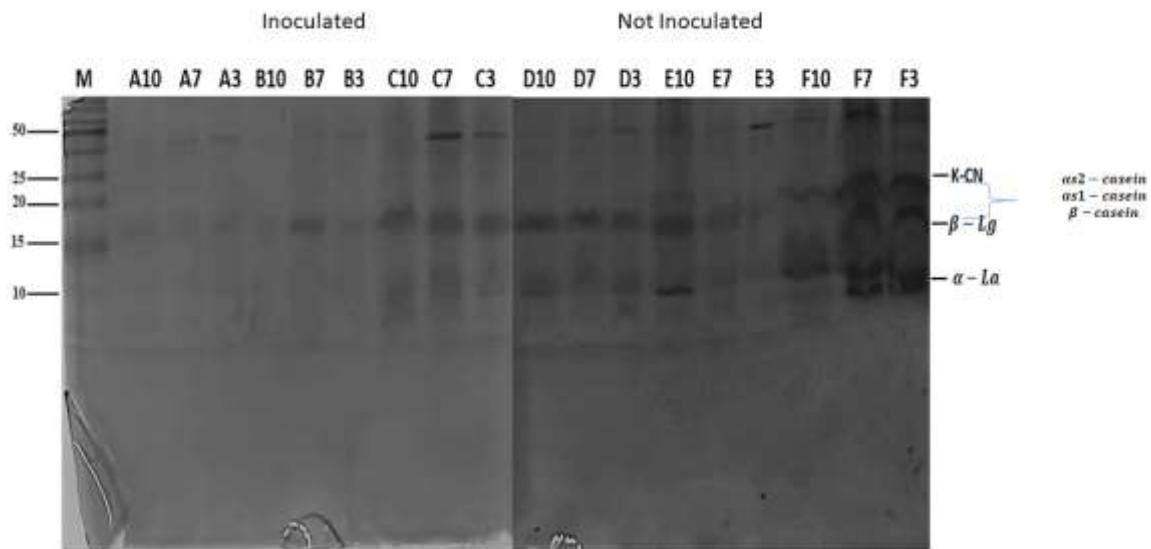


Fig 3 . SDS-PAGE electrophoresis pattern of inoculated and non-inoculated skim milk after thermal treatment and storage on days 3, 7, and 10, showing the degradation of α -, β -, and κ -casein bands in inoculated groups A, B, and C, and non-inoculated groups D, E, and F.

A: Inoculated sample, initially stored at 4 °C; B: Inoculated sample, initially stored at 10 °C; C: Inoculated sample, initially stored at 25 °C; D: Non-inoculated sample, initially stored at 4 °C; E: Non-inoculated sample, initially stored at 10 °C; F: Non-inoculated sample, initially stored at 25 °C.

شدت تخریب پروتئین بیشتر شده است، در حالی که در نمونه‌های تیمار نشده تغییرات روند کاهش‌ی دارد؛ نتایج حاصل نشان‌دهنده نقش پروتئازهای باکتریایی در افزایش شدت تخریب است.

جدول 3 شدت پروتئولیز دو حالت تلقیح شده و تلقیح نشده را نشان می‌دهد که مقایسه آن‌ها مشخص می‌کند که، حضور باکتری عامل تفاوت‌های اصلی در شدت پروتئولیز است. علاوه بر این اندازه‌گیری‌ها در روزهای ۳، ۷ و ۱۰ نشان می‌دهد با افزایش زمان در نمونه‌های تیمار شده

Table 3. Descriptive statistical summary of protein band intensities (BAND)

Group	Time (days)**	N	Mean $\pm$ SD	Minimum	Maximum
Inoculated	3	3	3.33 $\pm$ 0.58 ^{a*}	3	4
	7	3	3.67 $\pm$ 0.58 ^a	3	4
	10	3	4.67 $\pm$ 0.58 ^b	4	5
Total	—	9	3.89 $\pm$ 0.78	3	5
Not inoculated	3	3	4.67 $\pm$ 0.58 ^b	4	5
	7	3	3.67 $\pm$ 1.15 ^a	3	5
	10	3	3.33 $\pm$ 0.58 ^a	3	4
Total	—	9	3.89 $\pm$ 0.93	3	5

*Different letters indicate significant differences at ($p \leq 0.05$)

**the incubation days at 25°C

۷ در برابر ۱۰) اختلاف معنی‌داری نداشتن ($p > 0.05$) و این موضوع گویای آن است که در غیاب باکتری یا عامل تیمار، شدت پروتئولیز در طول زمان تقریباً ثابت مانده و تنها نوساناتی غیرمعنی‌دار دیده می‌شود. مقایسه دو گروه نقش تعیین‌کننده حضور باکتری را در افزایش شدت پروتئولیز آشکار می‌کند، زیرا تنها نمونه‌های تیمار شده روند افزایشی معنی‌دار را نشان دادند، در حالی که نمونه‌های تیمار نشده تغییر قابل توجهی نداشتند؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پروتئازهای باکتریایی موجب تشدید تخریب پروتئین در طول زمان می‌شوند و در غیاب باکتری این فرآیند محدود و غیرمعنی‌دار باقی می‌ماند.

نتایج آزمون‌های تعقیبی در جدول ۴ نشان داد که در گروه تلقیح شده، شدت پروتئولیز به‌مرور زمان تغییر معنی‌داری دارد؛ به‌گونه‌ای که بیشترین اختلاف میانگین بین روزهای ۳ و ۱۰ مشاهده شد و این مقایسه در آزمون LSD معنی‌دار بود ($p \leq 0.05$) و در آزمون Tukey نیز در مرز معنی‌داری قرار گرفت، در حالی که مقایسه‌های روزهای ۳ و ۷ و نیز ۷ و ۱۰ تفاوت معنی‌داری نشان ندادند ($p > 0.05$). این الگو بیانگر افزایش تدریجی تخریب پروتئین با طولانی شدن مدت تماس نمونه با عامل تیمار است، هرچند برخی تغییرات هنوز به سطح معنی‌داری نمی‌رسند. در گروه تلقیح نشده، هیچ‌یک از مقایسه‌های زمانی (۳ در برابر ۷، ۷ در برابر ۱۰ و

Table 4. Post hoc test results – pairwise comparisons

Treatment	Comparison (Time)	Mean Difference	p-value (LSD)	p-value (Tukey)
Inoculated	Group 3 vs. Group 7 ^a	-0.33	0.506	0.768
	Group 3 vs. Group 10 ^b	-1.33	0.030	0.067
	Group 7 vs. Group 10 ^a	-1.00	0.078	0.165
Not inoculated	Group 3 vs. Group 7 ^a	1.00	0.184	0.355
	Group 3 vs. Group 10 ^a	1.33	0.092	0.193
	Group 7 vs. Group 10 ^a	0.33	0.635	0.874

Different letters (a, b) indicate significant differences at $p \leq 0.05$ (LSD test). Groups sharing the same letter are not significantly different

حرارت دیده شد. نتایج مقایسه نهایی نشان می‌دهد که تیمار شده‌ها همگی روند افزایشی تخریب با زمان داشتند، اما ترتیب شدت تخریب $A > B > C$ بوده، در حالی که در نمونه‌های بدون تلقیح روند تغییرات ملایم یا کاهشی است و فعالیت آنزیم‌های طبیعی شیر عامل اصلی تغییرات محدود محسوب می‌شود. همانند نتایج گزارش Glück و همکاران (۲۰۱۶) [28] این مطالعه نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت تولید شده توسط باکتری‌های جنس *Pseudomonas* به‌ویژه *P. protegens KSM-1* نقش مهمی در ژله‌ای شدن شیر فرادما طی دوره نگهداری ایفا می‌کند. اگرچه هیچ یک از ایزوله‌ها با استفاده از پرایمرهای رایج حضور ژن *AprX* را نشان ندادند که احتمالاً به دلیل تنوع در کدون آغازین است،

مجموع نتایج ژل و جداول نشان می‌دهد که بیشترین تخریب پروتئینی مربوط به گروه A بوده است که ابتدا در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شده و سپس در ۲۵ درجه ادامه یافته و به دلیل سازگاری بهتر باکتری با شرایط سرد و فعال شدن شدید آنزیم در دمای بالاتر، پروتئولیز در آن شدیدتر رخ داده است. گروه B با نگهداری اولیه در ۱۰ درجه سانتیگراد شدت متوسطی از تخریب نشان داد و گروه C که از ابتدا در ۲۵ درجه بوده است کمترین میزان تخریب را میان گروه‌های تلقیح شده داشته و این نشان می‌دهد که تنش اولیه دمایی در ۴ و ۱۰ درجه محرک افزایش فعالیت آنزیمی پس از انتقال به ۲۵ درجه است. در مقابل، گروه‌های بدون تلقیح یعنی D، E و F الگوهای پایدار و با کمترین تغییر را نشان دادند و تنها تخریب خفیف ناشی از پلاسمین و

بین روزهای ۳ و ۱۰، در حالی که در نمونه‌های بدون تلقیح تغییر معناداری وجود ندارد. مقایسه گروه‌های دمایی نشان داد که بیشترین تخریب مربوط به نمونه‌هایی است که ابتدا در ۴ درجه نگهداری و سپس به ۲۵ درجه منتقل شدند که بیانگر اثر تحریک‌کننده تنش سرد بر فعال‌سازی آنزیم‌هاست. مجموع یافته‌ها نشان می‌دهد که *P. protegens* KSM1 با تولید آلکالین پروتئازهای مقاوم به حرارت می‌تواند عامل مهم بروز ژله‌ای شدن و کاهش کیفیت شیر فرادما باشد و کنترل آلودگی اولیه در زنجیره سرد برای جلوگیری از فساد پروتئینی ضروری است.

دسترسی به داده‌ها

تمامی داده‌های تولیدشده یا تحلیل‌شده در این پژوهش در همین مقاله منتشرشده و جداول آن ارائه شده‌اند. بنابراین، تمامی اطلاعات موردنیاز برای ارزیابی، تفسیر و پشتیبانی از یافته‌های این مطالعه در دسترس خوانندگان قرار دارد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تعارض منافع یا منافع رقابتی در ارتباط با انتشار این مقاله ندارند.

بیانیه تأمین مالی

این پژوهش با حمایت مالی اعتبارات پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان (GUASNR)، گرگان، ایران انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

میثم صالحی سیچانی به‌عنوان پژوهشگر اصلی، مسئول نگارش مقدمه و نظارت کلی بر اجرای پژوهش بود. مرتضی خُمیری به‌عنوان همکار پژوهشگر اصلی، در طراحی روش‌شناسی، تحلیل داده‌ها و نظارت علمی بر پژوهش مشارکت داشت. سودابه رستمی، علیرضا صادقی ماهونک،

شواهد مستقیم پروتئولیز در آزمایش SDS-PAGE این فعالیت آنزیمی را تأیید کرد. تحلیل آماری (ANOVA و آزمون‌های تعقیبی) کاهش معنادار ($p \leq 0.05$) در شدت باندهای کازئین α_s ، β و κ ، در نمونه‌های تلقیح‌شده نسبت به شاهد نشان داد، که این کاهش در روز دهم نگهداری مشهودتر بود. ظهور باندهای کم‌وزن مولکولی و الگوی تخریب گسترده در SDS-PAGE، فعالیت قوی آلکالین پروتئازهای باکتریایی را حتی پس از فرآیند حرارتی فرادما تأیید می‌کند. این یافته‌ها بر ضرورت کنترل آلودگی اولیه و هدیریت دقیق زنجیره سرد به منظور جلوگیری از فساد پروتئینی در شیر تأکید دارد.

۴- نتیجه گیری

در این تحقیق، جداسازی، شناسایی و ارزیابی رفتار پروتئولیتیک ایزوله‌های *Pseudomonas* در شیر خام با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی، مولکولی و الکتروفورزی به‌صورت جامع انجام شد. شناسایی فنوتیپی، ویژگی‌های کاملاً سازگار با جنس *Pseudomonas* از جمله اکسیداز مثبت، غیرتخمیری بودن و الگوی K/K در TSI را نشان داد و تکثیر ژن ۱۶S rRNA، شناسایی گونه‌ای دقیق را امکان‌پذیر ساخت که طی آن یکی از ایزوله‌ها با شباهت ۹۷ درصد به گونه‌های باین باکتری با کد دسترسی H78 و CM-YJ10_15-44 به‌عنوان *Pseudomonas protegens* KSM1 تعیین هویت شد. بررسی تنوع ژنتیکی با RAPD-PCR، خوشه‌بندی مشخص گونه‌ها و تمایز ژنتیکی محسوس میان ایزوله‌ها را تأیید کرد. ارزیابی پروتئولیز با SDS-PAGE نشان داد که نمونه‌های تلقیح‌شده در مقایسه با نمونه‌های شاهد تخریب شدیدتری در نوارهای α_s ، β - و κ کازئین دارند و ظهور بلندهای ۵۰ کیلودالتن و قطعات کم‌وزن مولکولی شاخص فعالیت آلکالین پروتئازهای مقاوم به حرارت *Pseudomonas* است. تحلیل آماری ANOVA و آزمون‌های تعقیبی ثابت کرد که در نمونه‌های تلقیح‌شده، افزایش زمان نگهداری به‌طور معناداری، شدت پروتئولیز را تشدید می‌کند، به‌ویژه

ویرایش نگارشی، بهبود ساختار جملات، شفافیت متن و افزایش خوانایی استفاده شده است و بر اساس ارزیابی سامانه **Undetectable AI**، میزان محتوای منتسب به هوش مصنوعی در این نسخه ۰.۵٪ گزارش شده است. در تهیه نسخه انگلیسی مقاله، به منظور ترجمه متن از فارسی به انگلیسی، عمدتاً از ابزارهای هوش مصنوعی استفاده شده و بر اساس ارزیابی همان سامانه، میزان محتوای منتسب به هوش مصنوعی ۸.۴٪ گزارش شده است. با این وجود، تمامی ترجمه‌ها، اصلاحات زبانی و نسخه نهایی مقاله توسط نویسندگان به طور کامل بازبینی، ویرایش و تأیید شده و مسئولیت کامل صحت، اصالت، یکپارچگی داده‌ها، تحلیل‌ها و محتوای علمی مقاله بر عهده نویسندگان است.

۵-منابع

- [1] Xu, J., Wang, X., Zhao, X., Cao, H., Wang, Y., Xie, N., Li, X., Pang, X., Lv, J., & Zhang, S. (2024). Evaluation of UHT milk spoilage caused by proteases from psychrophilic bacteria based on peptidomics. *Food Chemistry: X*, 24, 102059. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.102059>
- [2] D’Incecco, P., Rosi, V., Fortina, M. G., Sindaco, M., Ricci, G., & Pellegrino, L. (2022). Biochemical, microbiological, and structural evaluations to early detect age gelation of milk caused by proteolytic activity of *Pseudomonas fluorescens*. *European Food Research and Technology*, 248(5), 2097–2107. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04033-8>
- [3] Ajmal, M., Nadeem, M., Gulzar, N., Ashraf, M., & Batool, M. (2025). Pasteurized and ultrahigh-temperature-treated milk. In A. Gomes da Cruz, T. Colombo Pimentel, E. A. Esmerino, & S. Verruck (Eds.), *Dairy foods processing. Methods and protocols in food science*. Humana. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4144-6>
- [4] Maier, C., Huptas, C., von Neubeck, M., Scherer, S., Wenning, M., & Lücking, G. (2020). Genetic organization of the AprX-lipA2 operon affects the proteolytic potential of *Pseudomonas* species in milk. *Frontiers in*

علی موبیدی و مجید مقدم در توسعه و ارزیابی روش‌شناسی، بازنگری انتقادی مقاله از نظر محتوای علمی و فکری، و نهایی‌سازی نسخه مقاله مشارکت داشتند. تمامی نویسندگان در بازنگری مقاله مشارکت کرده‌اند، نسخه نهایی را برای انتشار تأیید نموده‌اند و مسئولیت تمامی جنبه‌های این پژوهش را پذیرفته‌اند.

بیانیه استفاده از هوش مصنوعی

تمامی داده‌ها، نتایج، اعداد، جداول و یافته‌های ارائه‌شده در این مقاله حاصل انجام مستقیم آزمایش‌های پژوهشی توسط نویسندگان بوده و هیچ‌گونه داده، نتیجه آزمایشگاهی یا تحلیل آماری توسط ابزارهای هوش مصنوعی تولید نشده است. در نسخه فارسی مقاله، از هوش مصنوعی صرفاً برای

Microbiology, 11, 1190.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01190>

- [5] D’Incecco, P., Brasca, M., Rosi, V., Morandi, S., Ferranti, P., Picariello, G., & Pellegrino, L. (2019). Bacterial proteolysis of casein leading to UHT milk gelation: An applicative study. *Food Chemistry*, 292, 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.066>

- [6] Aguilera-Toro, M., Nielsen, S. D.-H., Kragh, M. L., Xiao, Y., Hansen, L. T., Rauh, V., Wiking, L., Poulsen, N. A., & Larsen, L. B. (2023). Peptidomic fingerprints of stored UHT milk inoculated with protease extracts from different *Pseudomonas* strains relative to AprX expression and visible spoilage. *Dairy*, 4(1), 83–97. <https://doi.org/10.3390/dairy4010005>

- [7] Maier, T., Schleifer, K., & Wagner, R. (2021). Simultaneous quantification of the most common and proteolytic *Pseudomonas* species in raw milk by multiplex qPCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(10), 4075–4089. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11109-0>

- [8] Mangin, I., Corroler, D., Reinhardt, A., & Gueguen, M. (1999). Genetic diversity among dairy lactococcal strains investigated by polymerase chain reaction with three arbitrary primers. *Journal of Applied Microbiology*,

86(3), 514–520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00699.x>

[9] Jorgensen, J. H., Carroll, K. C., Funke, G., Pfaller, M. A., Landry, M. L., Richter, S. S., & Warnock, D. W. (Eds.). (2015). *Manual of clinical microbiology* (11th ed.). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555817381>

[10] Yang, K., Dong, X., Li, J., Wang, Y., Cheng, Y., Zhai, Y., Li, X., Wei, L., Jing, M., & Dou, D. (2021). Type 2 Nep1-like proteins from the biocontrol oomycete *Pythium oligandrum* suppress *Phytophthora capsici* infection in Solanaceous plants. *Journal of Fungi*, 7(7), 496. <https://doi.org/10.3390/jof7070496>

[11] Zhang, C., Bijl, E., Svensson, B., & Hettinga, K. (2019). The extracellular protease AprX from *Pseudomonas* and its spoilage potential for UHT milk: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 834–852. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12452>

[12] Aguilera-Toro, M., Kragh, M. L., Thomasen, A. V., Piccini, V., Rauh, V., Xiao, Y., Wiking, L., Poulsen, N. A., Hansen, L. T., & Larsen, L. B. (2023). Proteolytic activity and heat resistance of the protease AprX from *Pseudomonas* in relation to genotypic characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, 391–393, 110147. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110147>

[13] Zhang, C., Bijl, E., Muis, K. E., & Hettinga, K. (2020). Stability of fat globules in UHT milk during proteolysis by the AprX protease from *Pseudomonas fluorescens* and by plasmin. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 179–190. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17150>

[14] MacFaddin, J. F. (2000). *Biochemical tests for identification of medical bacteria* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.

[15] Wagner, J., Short, K., Catto-Smith, A. G., Cameron, D. J., Bishop, R. F., & Kirkwood, C. D. (2008). Identification and characterisation of *Pseudomonas* 16S ribosomal DNA from ileal biopsies of children with Crohn's disease. *PLoS ONE*, 3(10), e3578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003578>

[16] Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., & Villani, F. (2009). Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology*, 26(2), 228–238. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.09.005>

[17] Paludetti, L. F., Kelly, A. L., & Gleeson, D. (2020). Effect of thermoresistant protease of *Pseudomonas fluorescens* on rennet coagulation properties and proteolysis of milk. *Journal of Dairy Science*, 103(5), 4043–4055. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17771>

[18] Mohammadi, A., Ghorbani, M., Sadeghi Mahoonak, A.R., Jafari, S.M. 2022. Evaluation and comparison of functional properties of whey protein isolate-inulin mixtures and conjugates. *Food Processing and Preservation Journal*, 14 (2), 71-88.

[19] Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). Williams & Wilkins.

[20] Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2007). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology* (12th ed.). Mosby Elsevier.

[21] Nomura, K., Onda, K., Murase, H., Hashiya, F., Ono, Y., Terai, G., Oka, N., Asai, K., Suzuki, D., Takahashi, N., Hiraoka, H., Inagaki, M., Kimura, Y., Shimizu, Y., Abe, N., & Abe, H. (2024). Development of PCR primers enabling the design of flexible sticky ends for efficient concatenation of long DNA fragments. *RSC Chemical Biology*, 5(4). <https://doi.org/10.1039/d3cb00212h>

[22] Basu, I., Gorai, B., Chandran, T., et al. (2022). Selection of start codon during mRNA scanning in eukaryotic translation initiation. *Communications Biology*, 5, 587. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03534-2>

[23] Campbell, M., Mahenthalingam, E., & Speert, D. P. (2000). Evaluation of random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4614–4615. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.12.4614-4615.2000>

[24] Hematzadeh, A., & Haghkhah, M. (2021). Biotyping of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human infections by

RAPD and ERIC-PCR. *Heliyon*, 7(9), e07967.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07967>

[25] Abdel-Rhman, S. H., & Rizk, D. E. (2021). Comparative assessment of different PCR-based typing methods of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Infection and Drug Resistance*, 14, 1019–1035.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S298838>

[26] Sharma, V., Firth, A. E., Antonov, I., Fayet, O., Atkins, J. F., Borodovsky, M., & Baranov, P. V. (2011). A pilot study of bacterial genes with disrupted ORFs reveals a surprising profusion of protein sequence recoding mediated by ribosomal frameshifting and transcriptional realignment. *Molecular Biology and Evolution*, 28(11), 3195–3211.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msr155>

[27] Gai, N., Uniacke-Lowe, T., O'Regan, J., Goulding, D. A., Affolter, M., Fuerer, C., & Kelly, A. L. (2025). Proteolytic pathways in bovine milk containing β -CN A1 or A2. *International Dairy Journal*, 164, 106200.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2025.106200>

[28] Glück, C., Rentschler, E., Krewinkel, M., Merz, M., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Stoeckel, M., Hinrichs, J., Stressler, T., & Fischer, L. (2016). Thermostability of peptidases secreted by microorganisms associated with raw milk. *International Dairy Journal*, 56, 186–197.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.01.025>



Scientific Research

Isolation and Identification of *Pseudomonas protegens* from raw milk and its Molecular-Proteomic Analysis in Gelation of Sterilized Skim Milk

Meysam Salehi Sichani¹, Morteza Khomeiri², Soodabeh Rostami³, Alireza Sadeghi Mahoonak², Ali Moayedi⁴, Majid Moghaddam⁵

1-PhD Student of Food Science and Technology- Food Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2-Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3-Assistant Professor, Research Center for Infectious and Tropical Diseases, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

5 -Professor, Department of Chemistry, University of Isfahan, Isfahan, Iran

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received: 2025/12/14

Review: 2026/01/19

Accepted: 2026/02/08

Keywords:

UHT milk,

Pseudomonas protegens,

gelation,

SDS-PAGE,

RAPD-PCR

DOI: 10.48311/fsct.2026.118261.82990

*Corresponding Author E-

The present study investigated the molecular mechanisms and functional aspects of proteolytic gelation in autoclave-sterilized milk, focusing on *Pseudomonas protegens* and other psychrotrophic species. Raw milk collected from dairy farms in Isfahan, was screened for the presence of *Pseudomonas* species, and the strain *P. protegens* KSM1 was selected for detailed analysis. PCR results showed that none of the isolates carried the *AprX* gene of 890 bp, and ORF analysis confirmed the presence of only short ORFs (<171 bp). The genetic diversity of 30 isolates was evaluated using RAPD-PCR with the XD5 primer, revealing similarity coefficients ranging from 0.79 to 1.00 and divergence up to 43%; *P. aeruginosa* formed a compact cluster, whereas *P. protegens*, *P. koreensis*, *P. putida*, and *P. fluorescens* were distributed across separate branches. SDS-PAGE analysis indicated that inoculated samples experienced severe casein degradation, and the presence of a marker band at 45–50 kDa indicated bacterial alkaline protease activity. Proteolysis in inoculated samples increased significantly, particularly between days 3 and 10 ($p \leq 0.05$), while control samples showed minimal changes. These findings demonstrate that bacterial proteases are the main contributors to protein degradation during storage. Among the isolates, *P. protegens* KSM1 represents a suitable model for studying protein spoilage mechanisms and developing strategies to prevent gelation in UHT milk.