

جداسازی و شناسایی فلور لاکتیکی کیمچی تولید شده در ایران بر پایه روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی

فریده طباطبایی یزدی^{۱*}، علیرضا وسیعی^۲، بهروز علیزاده بهبهانی^۲

۱- دانشیار و عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۱)

چکیده

کیمچی یک اصطلاح عمومی برای سبزیجات تخمیری است. هدف از انجام این مطالعه شناسایی فلور لاکتیکی کیمچی بر پایه روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی بود. در این پژوهش پس از انجام کشت‌های متوالی بر روی محیط‌های اختصاصی و مشاهده میکروسکوپی ۸۵ جدایه که با انجام آزمایش‌های اولیه به نظر می‌رسید جزء باکتری‌های اسید لاکتیک باشند، انتخاب شده و برای گروه‌بندی آن‌ها، آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تخمیر ۱۰ نوع کربوهیدرات‌های مختلف انجام پذیرفت. بر مبنای تست‌های بیوشیمیایی و تخمیر قند ۸۵ ایزوله به ۱۰ گروه تقسیم‌بندی شدند. از هر گروه چند ایزوله انتخاب و ژن ناحیه 16S rRNA آن‌ها به کمک پرایمرهای عمومی و با تکنیک PCR تکثیر داده شد. نتایج نشان داد که تنوع باکتری‌های اسید لاکتیک کیمچی شامل لاکتوباسیلوس پلانتراروم (۴۱/۱۷٪)، لاکتوباسیلوس فرمنتوم (۹/۴۱٪)، ائروکوکوس فاسیوم (۷/۰۶٪)، ائروکوکوس فکالیس (۳/۵۲٪)، لاکونوستوک سیتروم (۲/۳۳٪)، لاکونوستوک مزنتروئیدوس (۳/۵۲٪)، پدیدوکوکوس پنتوزاسئوس (۸/۲۳٪) و ویسلا سیاریا (۲۴/۷۰٪) بود. به طور کلی این فراورده‌ی تخمیری دارای تنوع فراوانی در فلور میکروبی خود می‌باشد که از میکروفلور طبیعی موجود در مواد خام مورد استفاده نشأت می‌گیرد. با توجه به این که باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند با تولید اسیدها و آنزیم‌های مختلف نقش مهمی را در ایجاد طعم و بافت مطلوب ایفا نمایند، بنابراین می‌توان از سویه‌های جدا شده از این محصول در صنعت غذا بهره برد.

کلید واژگان: کیمچی، فلور لاکتیکی، تست‌های بیوشیمیایی، توالی‌یابی ژن 16S rRNA

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

۱- مقدمه

کیمچی^۱ یک خوراک تخمیر شده سنتی است که از سبزیجات و ادویه جات گوناگون و البته بیشتر اوقات با نوعی کلم چینی به نام بانچو و فلفل قرمز درست می شود. کلمه ی کیمچی یک اصطلاح عمومی برای سبزیجات تخمیری است که از واژه ی چینی چیمچا^۲ به معنی سبزی شور گرفته شده است. به صورت سنتی مقدار زیادی کیمچی به صورت سالانه تولید می شود که بیشتر در فصل زمستان که دسترسی به سبزیجات تازه کاهش می یابد مصرف می گردد. کیمچی در واقع نوعی شوری تهیه شده از سبزی های مختلف است [۱]. این محصول فعالیت های ایمنی را افزایش داده، روند پیر شدن را کاهش می دهد و از یوست جلوگیری می کند، علاوه بر این کیمچی مکمل طعم سبزیجات نیز بوده و همانند یک غذای پروبیوتیک عمل می کند. به دلیل ارزش غذایی بالا، کیمچی می تواند منبع بسیار خوب و مناسبی از پروتئین، مواد معدنی، اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه ضروری باشد [۱]. غذاهای تخمیر شده در بسیاری از کشورها، به عنوان اجزای ضروری رژیم غذایی محسوب می شوند.

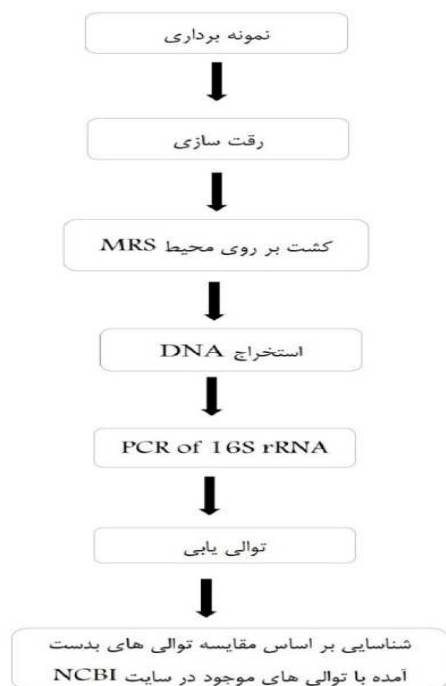
تخمیر مواد غذایی سنتی عمدتاً توسط میکروارگانیسم های طبیعی که در مواد خام حضور دارند صورت می گیرد که باکتری های اسید لاکتیک هم جزئی از این فلور طبیعی محسوب می شوند. باکتری های اسید لاکتیک گروه بزرگ و متنوعی از باکتری ها را شامل می شود، این باکتری ها گرم مثبت، فاقد توانایی تولید اسپور، کاتالاز منفی، مقاوم به اسید، بی-هوازی اختیاری و از لحاظ ظاهری اکثراً میله ای یا کروی هستند که توانایی تولید اسید لاکتیک را به عنوان محصول عمده نهایی تخمیر دارا می باشند. باکتری های اسید لاکتیک یکی از فراوان ترین گروه باکتری های مرتبط با انسان هستند [۱ و ۲]. آن ها به طور گسترده در اکوسیستم های مختلف وجود دارند و معمولاً در غذاهایی هم چون فراورده های لبنی، گوشت، سبزی های تخمیری، خمیر ترش، سیلاژ و نوشیدنی های الکلی یافت می شوند. بشر آگاهانه یا ناآگاهانه طی هزاران سال از

باکتری های اسید لاکتیک در تولید غذاهای تخمیری بهره برده است. این امر به خاطر توانایی این باکتری ها در ایجاد عطر و طعم و مهار پاتوژن ها و میکروارگانیسم های فاسدکننده می باشد [۲].

قبل از ظهور و گسترش روش های مولکولی، روش اصلی شناسایی باکتری های اسید لاکتیک بر مبنای خواص فنوتیپی باکتری ها بود، که شامل ویژگی های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می باشد [۳]. از آنجایی که کاربرد روش های فنوتیپی در شناسایی باکتری ها بسیار وقت گیر و طولانی است و نتایج حاصل عموماً از دقت بالایی برخوردار نمی باشد و نمی تواند به طور کامل و دقیق باکتری ها را در سطح گونه تفکیک نماید، لذا بهتر است جهت شناسایی باکتری ها از روش های مولکولی استفاده شود. واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) برای شناسایی سریع و دقیق باکتری های اسید لاکتیک در طی دو دهه اخیر پیشرفت فراوانی داشته است. امروزه روش توالی یابی ژن 16S rRNA به عنوان یکی از پرکاربردترین روش های موجود در شناسایی جمعیت میکروبی غذاهای تخمیری کاربرد دارد [۳].

بر اساس تحقیقات کیم و چانگ (۲۰۰۵) بر روی کیمچی، باکتری های اسید لاکتیک دخیل در تخمیر به جنس های لاکتوباسیلوس، لاکتوآنکیت و ویسلا تعلق داشتند. همچنین این پژوهش نشان داد که ویسلا کورنیسیس در همه ی نمونه ها حضور داشت و به عنوان گونه ی غالب معرفی شد. در مجموع با در نظر گرفتن پژوهش های مختلف که بر روی کیمچی انجام شده است، بیشترین باکتری های اسید لاکتیک که در تخمیر کیمچی نقش دارند به ترتیب از جنس های ویسلا، لاکتوباسیلوس، لاکتوآنکیت و پدیوکوکوس و انتروکوکوس هستند [۴-۶]. مطالعات مختلف انتشار یافته در خصوص کیمچی، برخی از اختلافات مربوط به ساختار و دینامیک جمعیت را آشکار نموده است. این مطالعات بر روی کیمچی تولیدی در مقیاس آزمایشگاهی یا کیمچی تجاری خریداری شده از تولیدکنندگان مختلف به اجرا درآمده است. علاوه بر این، کیمچی یک اصطلاح عمومی برای گروهی از غذاهای تخمیر شده بر پایه ی سبزی های مختلف می باشد که در فرآوری آن ممکن است بیش از صد نوع سبزی مورد استفاده قرار گیرد

1. Kimchi
2. Chimchae



شکل ۱ مراحل آزمایشات مربوط به شناسایی ایزوله های متعلق به

کیمچی با تکیه بر روش های مولکولی PCR 16S rRNA

۲-۲- جداسازی باکتری های اسید لاکتیک

ده گرم از نمونه به ۹۰ میلی لیتر از آب پیتون ۰/۱٪ منتقل شد (مرک، آلمان) و عمل هموژنیزه شدن انجام پذیرفت (مدل Seaward، آلمان). کشت سطحی از رقت های تهیه شده بر روی محیط کشت MRS Agar در سه تکرار انجام شد؛ به این ترتیب که روی هر پلیت ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت ریخته و به کمک اسپریدر پخش شد. در دو دمای ۳۰ و ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شد تا شرایط برای رشد باکتری های نامطلوب سخت تر گردد [۹]. از پلیت های دارای بالاترین رقت، کلنی هایی که از نظر شکل ظاهری، حاشیه ی کلنی، رنگ و سایر ویژگی های مورفولوژیکی متفاوت بودند، انتخاب شده و سپس هر کدام در پلیت جداگانه کشت خطی داده شدند و پس از چند بار کشت خطی کلنی های تک از هر ایزوله به دست آمد. برای نگهداری ایزوله ها به مدت طولانی، ایزوله ها در MRS broth حاوی گلیسرول ۱۵٪ (V/V) در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند [۱۰].

[۷]. لذا تفاوت های موجود در این نتایج، چندان تعجب آور نبوده و می تواند بر اساس تفاوت در شرایط فرآوری و نوع سبزی مورد استفاده، توجیه شود.

هدف از این پژوهش شناسایی و جداسازی فلور لاکتیکی کیمچی بر اساس روش های بیوشیمیایی و مولکولی می باشد، تا در نهایت با توجه به این که باکتری های اسید لاکتیک می توانند با تولید اسیدها و آنزیم های مختلف نقش مهمی را در ایجاد طعم و بافت مطلوب ایفا نمایند، بتوان از سویه های جدا شده از این محصول در صنعت غذا بهره برد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- تهیه کیمچی

مواد اولیه تولید کیمچی که شامل کلم چینی، ترب سفید، پودر فلفل قرمز، زنجبیل، عصاره ماهی و میگو، سیر، پیازچه، تره فرنگی، شکر، آرد برنج، آرد گندم و نمک از بازار های محلی در شهر مشهد خریداری شد. جهت تهیه شیرابه کیمچی ۱۲۰ گرم آرد برنج و آرد گندم پس از مخلوط شدن با آب، شکر و نمک حرارت داده شد تا ژلاتینه شود، سپس ۳۰ گرم زنجبیل، ۳۰ گرم پیازچه، ۵۰ گرم سیر و ۵۰ گرم تره فرنگی را کاملاً آسیاب کرده، به همراه تربچه نمک سود به آرد پخته شده اضافه شد. کاهوها با توجه به اندازه به چند قسمت تقسیم شده و به ازای هر صد گرم کاهو هفت گرم نمک بین برگ های آن پاشیده و به مدت شش ساعت تحت تیمار نمکی نگه داشته شدند و سپس سه بار آبکشی شدند. بعد مخلوط افزودنی ها و ترب سفید را به کاهو اضافه کرده و تک تک برگ ها کاملاً به آن آغشته شد. کاهو را به همراه عصاره با نسبت ۶۰ به ۴۰ در شیشه قرار داده شد و تخمیر آن در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد صورت گرفت تا pH آن به کمتر از ۴/۲ برسد [۱ و ۸]. جهت بررسی فلور لاکتیکی کیمچی، نمونه برداری در شرایط استریل انجام پذیرفت صورت گرفت.

آزمایشاتی که برای شناسایی فلور لاکتیکی کیمچی با کمک روش های مولکولی مبتنی بر کشت صورت گرفته به صورت کلی در شکل ۱، آورده شده است.

۲-۳- گروه بندی باکتری‌های اسید لاکتیک بر مبنای تست‌های بیوشیمیایی و پروفایل تخمیر کربوهیدرات

بعد از ایزوله کردن، تست‌های مرفولوژیکی شامل رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی شامل تست کاتالاز، رشد در دمای مختلف 10°C و 45°C ، زنده مانی در pH های $4/4$ و $9/6$ در محیط کشت MRS broth، آزمایش لوله دورهام جهت بررسی تولید گاز CO_2 در این محیط و هم چنین رشد درغلظت نمک $6/5$ درصد انجام پذیرفت. هیدرولیز آرژنین توسط جدایه‌ها در محیط MRS Broth بدون گلوکز و عصاره گوشت اما حاوی $0/3$ درصد آرژنین و $0/2$ درصد سیترات سدیم به جای سیترات آمونیوم انجام شد. سپس تولید آمونیاک توسط معرف نسلر بررسی گردید. تمامی آزمایش‌ها نیز در سه تکرار انجام پذیرفت [۱۱].

گروه‌بندی باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از ده نوع قند متفاوت (گلوکز، ساکارز، گالاکتوز، فروکتوز، لاکتوز، مالتوز، سوربیتول، رافینوز، مانیتول و ملی بیوز) و با استفاده از محیط کشت فنل رد برات (کازئین پپتون+ سدیم کلرید+ فنل رد) (کیولب، کانادا) انجام پذیرفت [۱۲].

۲-۴- شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از روش مولکولی PCR 16S rRNA

کشت‌های منجمد شده در محیط کشت MRS فعال‌سازی شدند و شناسایی بر اساس روش پلی-فازیک مولکولی که

شامل استخراج DNA، تکثیر ژن 16S rRNA، توالی‌یابی و در نهایت مقایسه توالی‌ها انجام پذیرفت.

۲-۴-۱- استخراج DNA

جهت استخراج DNA ایزوله‌ها، از کیت استخراج Genomic DNA isolation VI (دنا زیست آسیا، ایران) استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون اولیه هر جدایه برای شروع کار، هر یک از ایزوله‌ها در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت MRS Broth تلقیح شدند و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در 37°C درجه سانتی‌گراد، از ۱۰۰ میکرولیتر این سوسپانسیون برای ادامه‌ی کار استفاده شد. همه‌ی مراحل مطابق دستورالعمل کیت انجام پذیرفت. در پایان برای هر جدایه محلولی ۵۰ میکرولیتری حاوی DNA جدایه بدست آمد، که برای انجام مراحل بعد در فریزر -20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۴-۲- انجام واکنش PCR

برای توالی‌یابی و شناسایی دقیق ایزوله‌ها به روش مولکولی، تکثیر ژن 16S rRNA که بر اساس نواحی محافظت شده‌ی این ژن عمل می‌کند، انجام شد. برای انجام واکنش PCR از پرایمرهای عمومی ذیل استفاده شد (۱۳):

پرایمر Forward: 27FYM با توالی (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3')

پرایمر Reverse: 1492R با توالی (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')

مشخصات مخلوط واکنش در جدول ۱، آورده شده است.

جدول ۱ مشخصات اجزای واکنش دهنده PCR

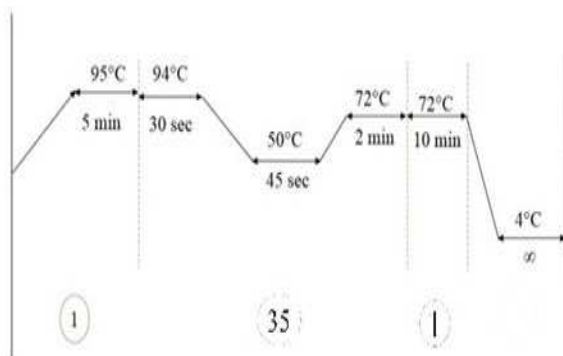
اجزای تشکیل دهنده‌ی واکنش	حجم مورد استفاده (میکرولیتر)	غلظت نهایی در واکنش
DNA الگو	۱/۵	۳ ng/μl
بافر PCR (10 X)	۲/۵	۱X
پرایمر پیشرو (۲۵ mM)	۱	۱ mM
پرایمر معکوس (۲۵ mM)	۱	۱ mM
DNTPs (۱۰ mM)	۲	۰/۳۲ mM
کلور منیزیم (۵۰ mM)	۱/۵	۲/۵ mM
آنزیم DNA-Taq پلیمراز (۵۰ U/μl)	۰/۲	۱ U/μl
آب دوبار تقطیر استریل	۱۵/۵	-
جمع	۲۵	-

دستگاه Gel Document تحت اشعه‌ی ماوراء بنفش عکس‌برداری صورت گرفت (۱۴ و ۱۵).

۲-۴-۴- تعیین توالی جدایه‌ها

پس از ارزیابی صحت انجام واکنش PCR توسط الکتروفورز و مشاهده‌ی باندها در موقعیت ۱۵۰۰ جفت بازی محصولات واکنش PCR جهت تعیین توالی به صورت خوانش یک طرفه از پرایمر 27F، به شرکت MacroGen ارسال شدند. پس از خوانش مجدد برای برخی ایزوله‌ها که در خوانش اولیه نتیجه‌ی مطلوبی برای آن‌ها حاصل نشده بود، توالی‌های بدست آمده با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی (NCBI)، BLAST شده و مشابه‌ترین سویه به ایزوله‌ی موردنظر تعیین گردید. تشابه بالای ۹۷ درصد به عنوان تشابه معنی‌دار تلقی شد.

سپس میکروتیوب حاوی مخلوط واکنش‌دهنده‌های PCR را داخل دستگاه ترموسایکلر (Sensquest (Germany قرار داده و برنامه‌ی دمایی و تعداد سیکل‌هایی مطابق شکل ۲، به دستگاه داده شد.



شکل ۱ پروفایل برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر

16S rRNA [۱۰]

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک نمونه‌های کیمچی در جدول ۲، آورده شده است. همانگونه که ملاحظه می‌شود میزان باکتری‌های مزوفیل در نمونه‌های کیمچی غالب‌تر می‌باشد. بیشترین تعداد شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد متعلق به نمونه شماره ۳ و بیشترین میزان شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد متعلق به نمونه شماره ۴ می‌باشد.

جدول ۲ اندازه‌گیری pH و شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک نمونه‌های کیمچی (CFU/g) در دماهای مختلف ۳۰ و ۴۵ درجه

سانتی‌گراد بر روی محیط کشت MRS

نمونه‌های کیمچی					
نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ۴	نمونه ۵	نمونه ۶
۳/۵۴	۳/۸۷	۴/۱۲	۳/۰۵	۳/۹۰	۳/۳۸
MRS (30°C)	۶/۳۰±۰/۲۳	۶/۴۵±۰/۱۷	۷/۸۲±۰/۴۲	۷/۱۲±۰/۳۰	۶/۹۵±۰/۳۳
MRS (45°C)	۴/۲۵±۰/۱۰	۳/۵۶±۰/۲۵	۴/۰۳±۰/۱۸	۴/۸۲±۰/۳۵	۴/۴۵±۰/۲۶

مورفولوژیکی و شکل کلنی‌های آن‌ها با باکتری‌های اسید لاکتیک هم‌خوانی داشت برای انجام تست‌های بعدی انتخاب شدند.

پس از انجام رنگ آمیزی گرم و بررسی مورفولوژی جدایه‌ها و نیز انجام تست کاتالاز، ۸۵ جدایه از مرحله پایانی تخمیر که گرم مثبت و کاتالاز منفی بوده و ویژگی‌های

۸۵ جدایه‌ی انتخاب شده بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی در حد جنس شناسایی گردیدند (جدول ۳). بر این اساس، گروه یک در برگیرنده‌ی باسیل‌های هوموفرمنتاتیوی بود که در دمای 10°C و $\text{pH}=4/4$ رشد کرده، اما قادر به هیدرولیز آرژنین نبودند، این گروه به عنوان لاکتوباسیلوس‌های هوموفرمنتاتیو شناسایی شدند. گروه دوم در برگیرنده‌ی باسیل‌های هتروفرمنتاتیوی بود که آرژنین را هیدرولیز نموده و در دمای 10°C و $\text{pH}=9/6$ به خوبی رشد می‌کردند، این گروه به عنوان لاکتوباسیلوس‌های هتروفرمنتاتیو در نظر گرفته شدند. گروه سوم شامل باسیل‌های کوتاه گرم مثبت، کاتالاز منفی و هتروفرمنتاتیو که آرژنین را هیدرولیز نموده و در دماهای 10°C و 45°C قادر به رشد بودند، اما در $\text{pH}=9/6$ رشد نکردند، این گروه به عنوان ویسلا شناسایی گردیدند. گروه چهار شامل

کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و هوموفرمنتاتیو با آرایش سلولی تتراد بود که در دمای 10°C و $\text{pH}=9/6$ رشد نکرده، اما قادر به رشد در غلظت $6/5$ درصد نمک بودند و به عنوان پدیوکوکوس شناسایی شدند. در گروه پنج کوکسی‌هایی قرار داشتند که ویژگی‌هایی شبیه به گروه ۳ داشتند با این تفاوت که قادر به رشد در 45°C و هیدرولیز آرژنین نبودند، این گروه به عنوان لاکونوستوک در نظر گرفته شدند. و در نهایت کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، هوموفرمنتاتیو قادر به رشد در دماهای 45°C و نیز قادر به رشد در غلظت $6/5$ درصد نمک؛ که در $\text{pH}=4/4$ و $\text{pH}=9/6$ نیز رشد نمودند در گروه شش جای گرفته و به عنوان جنس انتروکوکوس در نظر گرفته شدند. [۱۶-۱۹].

جدول ۳ نتایج آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های کیمچی

شماره گروه	درصد (%)	رشد در 10°C	رشد در 45°C	رشد در $\text{pH}=4/4$	رشد در $\text{pH}=9/6$	رشد در ۵٪ نمک	هیدرولیز آرژنین	تولید گاز CO_2
۱	۴۱/۱۷	+	-	+	±	±	-	-
۲	۹/۴۱	+	±	-	+	-	+	+
۳	۲۴/۷۰	+	+	±	-	±	+	+
۴	۸/۲۳	-	±	+	-	+	+	-
۵	۵/۸۸	+	-	±	-	±	-	+
۶	۱۰/۵۸	+	+	+	+	+	+	-

+ رشد باکتری - عدم رشد باکتری

۲-۳ نتایج آزمایش تخمیر کربوهیدرات‌های

مختلف

امروزه نتایج شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک با روش‌های فنوتیپی (حتی استفاده از کیت API) به هیچ عنوان معتبر و موثق نبوده و نتایج رضایت بخشی ارائه نمی‌دهد. به این دلیل از نتایج حاصل از تخمیر کربوهیدرات‌ها صرفاً برای گروه‌بندی جدایه‌ها استفاده شد تا بر اساس این نتایج از هر گروه چند جدایه جهت شناسایی دقیق با روش مولکولی انتخاب شوند. بر این اساس جدایه‌ها در ۱۰ گروه طبقه بندی شدند، مبنای انتخاب و مقایسه‌ی قندها جلد سوم کتاب Bergey's

Systematic Manual of بود. جدول ۴، نتایج حاصل از گروه‌بندی باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از روش تخمیر کربوهیدرات را نشان می‌دهد. ۹/۴۱ درصد جدایه‌ها (شامل ۸ جدایه) در گروه یک قرار گرفتند؛ که بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی لاکتوباسیلوس‌های هتروفرمنتاتیو بودند، ۲۳/۵۲ درصد (شامل ۲۰ جدایه) در گروه دو و ۱۱/۷۴ درصد (شامل ۱۰ جدایه) در گروه سه قرار گرفتند؛ جدایه‌های این دو گروه قبلاً به عنوان لاکتوباسیلوس‌های هوموفرمنتاتیو شناسایی شده بودند. همه‌ی جدایه‌هایی که قبلاً به عنوان جنس ویسلا شناسایی شدند یعنی ۲۴/۷۰ درصد جدایه‌ها (شامل ۲۱ جدایه)

دو گروه بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی به عنوان جنس لوکونوستوک شناخته شده بودند. و سرانجام جدایه‌هایی که قبلاً بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی به عنوان اتروکوکوس شناسایی شده بودند در دو گروه نه و ده قرار گرفتند؛ ۳/۵۲٪ از جدایه‌ها (شامل ۳ جدایه) در گروه نه و ۷/۰۶٪ (شامل ۶ جدایه) در گروه ده [۱۲].

در گروه چهار قرار گرفتند. همه‌ی جدایه‌هایی که به جنس پدیوکوکوس تعلق داشتند (۸/۲۳ درصد، شامل ۷ جدایه) در گروه پنج قرار گرفتند. گروه شش نیز با داشتن ۵/۸۸٪ جدایه‌ها (۵ جدایه) متعلق به گروه باسیل‌های هوو فرمنتاتیو بود. گروه هفت، با داشتن ۳/۵۲٪ از جدایه‌ها (شامل ۳ جدایه) و گروه هشت ۲/۳۵ درصد از جدایه‌ها (۲ جدایه) را شامل شدند؛ این

جدول ۴ نتایج حاصل از تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف توسط جدایه‌ها

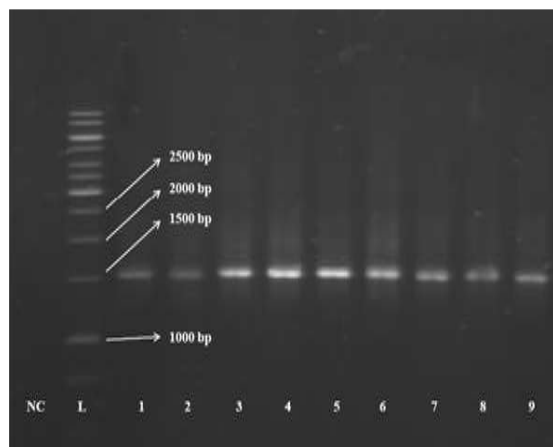
کربوهیدرات	شماره گروه									
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
گلوکز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ساکارز	+	+	+	+	V	+	+	+	-	+
گالاکتوز	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
فروکتوز	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
لاکتوز	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
مالتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
سوربیتول	-	+	+	V	-	+	-	-	-	-
رافینوز	-	V	+	-	-	-	-	-	+	-
مانیتول	v	+	+	-	-	+	+	+	V	+
ملیبیوز	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-

V: نتایج یکسانی برای همه‌ی جدایه‌ها بدست نیامد

۳-۳- شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک

کیمچی با کمک روش مولکولی

با توجه به گروه‌بندی که توسط آزمایش‌های مبتنی بر کشت به دست آمد، در مجموع ۲۳ جدایه از گروه‌های مختلف انتخاب و مورد آزمون قرار گرفت. ابتدا DNA جدایه‌های مورد نظر استخراج شد. در مرحله‌ی بعد با کمک پرایمرهای عمومی 27FYM و 1492R تکثیر ژن rRNA 16S انجام گرفت. باندهای ایجاد شده از نظر اندازه در مکان ۱۵۰۰ جفت بازی بودند (شکل ۲).



شکل ۲ باندهای ۱۵۰۰bp حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA. NC:

کنترل منفی، L: نشانگر 1kp، ۱-۹: جدایه‌های کیمچی

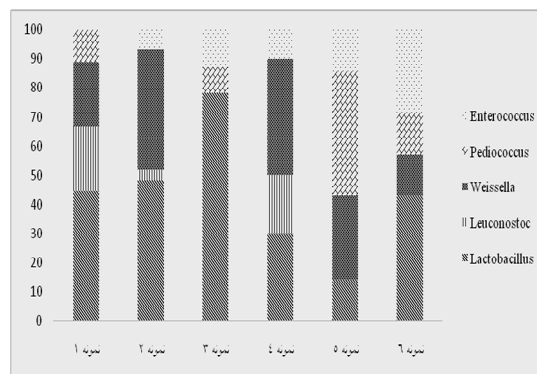
نتایج توالی‌یابی نشان داد که جمعیت غالب متعلق به جنس لاکتوباسیلوس می‌باشد که به دو جنس پلانتاروم (۴۱/۱۷) و فرمنتوم (۹/۴۱) تقسیم می‌شدند. بقیه باکتری‌ها متعلق بودند به جنس‌های: ویسلا (سیباریا) (۲۴/۷۰)، پدیوکوکوس پنتوزا سئوس (۸/۲۳)، آنتروکوکوس (فکالیز و فاسیوم) (۱۰/۵۸) و لوکونوستوک (سیترونوم و مزنتروئیدوس) (۵/۸۷). نتایج حاصل از توالی‌یابی در جدول ۵، آورده شده است.

جدول ۵ شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک کیمچی با استفاده از روش مولکولی

کد دسترسی	درصد شباهت (%)	نزدیک‌ترین سویه در پایگاه داده NCBI	کد جدایه
NR_075041.1	99	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	B33
NR_074694.1	99	<i>Leuconostoc citreum</i> KM20	C13
KF149163.1	100	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain IMAU32489	A71
NR_102790.1	98	<i>Enterococcus faecium</i> Aus0004	E8
NR_075033.1	99	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	B28
NR_036924.1	100	<i>Weissella cibaria</i> II-I-59	G21
EU626010.1	100	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain KLDS 1.0725	E22
EU626010.1	98	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain KLDS 1.0725	C32
EU419592.1	99	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain KLDS 1.0613	B12
NR_075052.1	100	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	A55
KC568549.1	100	<i>Enterococcus faecium</i> strain FS019	E18
NR_036924.1	100	<i>Weissella cibaria</i> II-I-59	C13
KF149163.1	98	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain IMAU32489	C12
NR_075041.1	99	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	A16
KF418815.1	100	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain FQ002	B32
NR_075052.1	99	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	B19
NR_074957.1	98	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	A20
EU626010.1	100	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain KLDS 1.0725	A4
NR_074694.1	100	<i>Leuconostoc citreum</i> KM20	G12
AEKT01000000	100	<i>Weissella cibaria</i> KACC 11862	A60
AB854180.1	100	<i>Lactobacillus plantarum</i> PD412	C4
NR_074637.1	98	<i>Enterococcus faecalis</i> V583 strain V583	B34
NR_036924.1	100	<i>Weissella cibaria</i> II-I-59	E51

برای درک هر چه بهتر اکولوژی باکتری‌های اسید لاکتیک نمونه‌های کیمچی، توزیع جمعیت باکتریایی با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت در شکل ۳، آورده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود توزیع جمعیت در اغلب نمونه‌ها به خوبی اتفاق افتاده است.

پایین جدایه‌هایی که به عنوان لوکونوستوک در این پژوهش شناسایی شدند، می‌تواند به دلیل توانایی رقابت پایین اعضای این جنس با سایر باکتری‌های اسید لاکتیک و نیز عدم توانایی رشد در pH های پایین باشد. همچنین می‌توان قدرت ضعیف این جنس در رشد بر روی محیط انتخابی و در نتیجه دشواری جداسازی آن را نیز یکی دیگر از دلایل حضور کم رنگ این جنس دانست [۱۸ و ۲۵]. چو و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه‌ی دیگری جهت تعیین تنوع میکروبی با استفاده از روش‌های مختلف مبتنی بر تکثیر ژن 16S rRNA بر پایه‌ی آزمون آنزیم‌های برش‌دهنده، مشخص نمودند که ۹۷۰ باکتری جدا شده از کیمچی متعلق به ۱۵ گونه از جنس‌های لاکتوباسیلوس، لوکونوستوک و ویسلا هستند. با بررسی تاثیر دمای تخمیر توسط این محققان، مشاهده شد که گرمخانه‌گذاری مقدماتی دو روزه در ۱۵ درجه سانتی‌گراد برای جنس لوکونوستوک مطلوب است؛ در حالی که گونه‌ی ویسلا کورینسیس در مرحله‌ی دوم تخمیر که در دمای ۱- درجه سانتی‌گراد انجام شد، غالب می‌گردد [۲۶]. مطالعات دیگری بر روی فلور میکروبی کیمچی با استفاده از روش‌های مستقل از کشت صورت گرفته است. ارزیابی کتابخانه‌های همسانه‌سازی ژن 16SrRNA با استفاده از برش محدود DNA ریبوزومی تکثیر یافته (ARDRA) و تعیین توالی آن نشان داد که ویسلا کورینسیس تنها گونه‌ی موجود در تمام نمونه‌های کیمچی حاصل از پنج واحد تولیدی بود. در واقع این سویه مهم‌ترین گونه‌ی غالب و پس از آن جنس‌های لوکونوستوک و لاکتوباسیوسگزارش شدند [۲۷]. لی و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از PCR-DGGE برای بررسی جمعیت میکروبی، دریافتند که در نمونه‌های کیمچی تخمیر شده در دماهای ۱۰ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب به مدت ۳۰ و ۲۰ روز تا ۱۲ باند مشاهده می‌شود. نتایج تعیین توالی نشان داد که میکروارگانیسم‌های اصلی مسئول در تخمیر کیمچی ویسلا کانفیوزا، لوکونوستوک سیتروم، لاکتوباسیلوس ساکی و لاکتوباسیلوس کارواتوس بودند. باندهای ویسلا کانفیوزا و لوکونوستوک سیتروم در طول فرایند تخمیر باقی ماند که اهمیت آن‌ها را در تخمیر کیمچی نشان می‌دهد. لاکتوباسیلوس ساکی و لاکتوباسیلوس کارواتوس نیز به عنوان اجزای شاخص در جمعیت باکتریایی شناسایی گردیدند [۶]. پدیوکوکوس



شکل ۳ توزیع باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در نمونه‌های کیمچی

همانطور که قبلاً نیز اشاره شد تخمیر به وسیله‌ی میکروارگانیسم‌های اولیه‌ی موجود در بافت سبزی اولیه شروع می‌گردد و به طور طبیعی جنس‌های لاکتوباسیلوس، لوکونوستوک و پدیوکوکوس بر روی گیاهان یافت می‌شوند [۲۰]. سویه‌های جنس ویسلا نیز به طور گسترده‌ای در طبیعت پراکنده هستند. ویسلا سیاریا در غذاهای تخمیری بسیاری (کاساوا، خمیر ترش و نوشیدنی ژاپنی الکی شوچو) یافت شده است [۲۱، ۲۲، ۲۳]. نتایج تحقیق امرنینی و همکاران (۲۰۱۳)، نشان داد که گونه‌های ویسلا در سبزی‌ها و میوه‌های تازه گونه‌ی غالب هستند. بر اساس این مطالعه، گونه‌ی غالب در سبزی‌های تازه ویسلا سیاریا بود و پس از آن نیز ویسلا کانفیوز قرار داشت [۲۴]. نخستین مطالعات مبتنی بر استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی میکروارگانیسم‌های جدا شده از کیمچی، اغلب به موازات تعیین خصوصیات فنوتیپی صورت گرفته‌اند. به عنوان مثال چوی و همکاران (۲۰۰۲)، با استفاده از تعیین توالی ژن 16S rRNA نشان دادند که ۶۸ درصد از ۱۲۰ باکتری اسید لاکتیک جدا شده از کیمچی، متعلق به گونه‌ی لوکونوستوک سیتروم هستند. سایر گونه‌های غالب شامل لاکتوباسیلوس ساکی، لاکتوباسیلوس ساکی، لاکتوباسیلوس ساکی و ویسلا کانفیوزا بودند. لوکونوستوک پنتوزاسئوس در حین مراحل اولیه و میانی تخمیر کیمچی، غالب بود در حالی که سایر باکتری‌ها در مراحل بعدی مشاهده شدند [۴]. درصد

4. Cassava
5. Shochu

شناسایی لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه لاکتیس، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه دلبروکی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس پلانٹاروم، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی بر اساس ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی کار دشواری است، زیرا این باکتری‌ها در بسیاری از ویژگی‌ها مشترک هستند [۳۱]. همچنین نتایج آزمایش‌های فنوتیپی برای جنس‌های لوکونوستوک و ویسلا عمده‌تاً جواب‌های مبهم و غیر قابل استنادی را ارائه می‌دهد، چرا که هر دوی این جنس‌ها هتروفرم‌تاتیو بوده و الگوی تخمیر مشابه دارند [۳۲].

۴- نتیجه‌گیری

شناسایی سویه‌های متنوع و مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک در کیمچی می‌تواند بیانگر خصوصیات تغذیه‌ای بسیار مناسب این ماده غذایی باشد. در این پژوهش، روش‌های سنتی و بیوشیمیایی و همچنین توالی‌یابی 16S rRNA برای شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک استفاده شد. طبق نتایج به دست آمده مشاهده می‌شود هر روش مزایا و معایب خاص خود را داراست. روش‌های شناسایی سنتی مبتنی بر خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی وقت‌گیر و نه چندان دقیق و موثق می‌باشند. هم‌طور، توالی‌یابی 16S rRNA اگر چه سریع و قابل اعتماد می‌باشد اما ممکن است نتایج حاصل از این روش گنجش کننده باشند که علت آن، اطلاعات وسیع مربوط به توالی‌یابی در بانک اطلاعاتی NCBI می‌باشد. بنابراین، استفاده از روش‌های پلی-فازیک برای شناسایی هر سویه ضروری به نظر می‌رسد که در این پژوهش از روش پلی‌فازیک استفاده شد. نتایج این پژوهش می‌تواند سرفصلی برای آزمایشات دیگر بر روی این باکتری‌های مفید واقع گردد؛ از جمله بررسی خصوصیات پروبیوتیکی و تکنولوژیکی سویه‌ها، شناسایی ایزوله‌ها با روش‌های غیرمبتنی بر کشت مولکولی و مقایسه با نتایج حاصل از این پژوهش، بررسی خصوصیات ضدباکتریایی، بررسی ویژگی‌های پروتئولیتیک و لیپولیتیک سویه‌های ایزوله شده از کیمچی.

پتئوز/سئوس در بسیاری از تخمیرهای گیاهی نقش دارد و در تخمیر این فراورده نیز حضور داشت، که می‌توان آن را به تحمل غلظت زیاد نمک و قدرت تطبیق بالای این سویه با شرایط اسیدی نسبت داد [۱۱]. تخمیر لاکتیکی در گیاهان وابسته به یک ارگانیسم خاص نیست بلکه گروهی از میکروارگانیسم‌ها در آن شرکت دارند. به طوری که در ابتدا طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها حضور دارند که شامل باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی، قارچ‌ها و مخمرها می‌باشند. با شروع فرایند تخمیر و نامساعد شدن شرایط برای رشد، به دلایل مختلف از جمله تولید اسید و یا مواد مهارکننده، رشد اکثر آن‌ها مهار می‌گردد. اما میکروارگانیسم‌هایی که به این شرایط حساسیت کمتری دارند، که اصولاً باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها هستند، باقی می‌مانند. این مرحله تخمیر اولیه^۶ نامیده می‌شود. با کاهش اسیدیته در مرحله‌ی بعدی که تخمیر ثانویه^۷ نام دارد، باکتری‌های اسید لاکتیک نیز مهار شده اما مخمرها همچنان باقی می‌مانند. پس از تخمیر، در تانک‌های سرباز، رشد باکتری‌های اکسیداتیو، مخمرها و کپک‌ها رخ می‌دهد. اما در شرایط بی‌هوازی اگر pH به اندازه‌ی کافی پایین و غلظت نمک بالا باشد این ارگانیسم‌ها قادر به رشد نخواهند بود. در واقع اکولوژی میکروبی به نوع فرایندهایی که طی دوره‌ی تخمیر رخ می‌دهد بستگی دارد. به همین دلیل است که وقتی یک تخمیر گیاهی خودبخودی تکرار می‌گردد یافته‌های دقیقاً یکسان و ثابتی به دست نمی‌آید [۲۸ و ۲۹]. وسیعی و همکاران (۲۰۱۴) اقدام به شناسایی فلور لاکتیکی ماده غذایی ترخینه و بررسی خاصیت پروبیوتیکی آن‌ها نمودند. نتایج حاصل بیانگر خواص بالای پروبیوتیکی سویه‌های متعلق به گونه‌های لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و فرمنتوم داشت. همچنین استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر کشت در شناسایی و افتراق باکتری‌های اسید لاکتیک پیشنهاد شد [۳۰]. همان طور که امروزه به روشنی می‌دانیم شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک که صرفاً بر پایه‌ی آزمایش‌های بیوشیمیایی استوار باشد با مشکلات زیادی همراه است و ممکن است باعث تشخیص اشتباه شود، برای مثال

6. Primary fermentation

7. Secondary fermentation

- [7] Kim M, and Chun, J. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 103: 91-96.
- [8] Jin-Gyu, Park, Jae-Hun, Kim, Jae-Nam, Park, Young-Duk, Kim, Wang-Geun, Kim, Ju-Woon, Lee, Han-Joon, Hwang, Myung-Woo, Byun. 2008. The effect of irradiation temperature on the quality improvement of Kimchi, Korean fermented vegetables, for its shelf stability. *Radiation Physics and Chemistry*. 77, 497-502.
- [9] Sengun I.Y, Nielsen D.S, Karapinar M, Jakobsen M. 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. *International Journal of Food Microbiology* 135(2), 105-111.
- [10] Edalatian MR, Habibi Najafi MB, Mortazavi A, Alegría Á, Nassiri MR, Bassami MR, Mayo B. 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.
- [11] Daeschel, M. Anderson R. E, and Fleming H. P. 1987. Microbial ecology of fermenting plant material. *Federation of European Microbiological Societies*. 46: 357-367.
- [12] Fitzsimons, N.A, Cogan, T.M, Condon, S, Beresford, T., 1999. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3418 - 3426.
- [13] Alegría, A., Álvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S., Mayo, B., 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology* 136, 44-51.
- [14] Platero, A., Maqueda, M. Valdivida, E., and Purswani, J. 2009. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiology*, 26: 294-304.

۵- تشکر و قدردانی

مقاله علمی _ پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۲/۲۰۱۸۹ مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

۶- منابع

- [1] Tabatabaei Yazdi F, Mohebbi M, Mortazavi SA, Alizadeh Behbahani B, Ghaitaranpour A, Jouki M. 2012. Isolation, identification and comparison of lactic acid bacteria from fermented be produced in Iran Kimchi with Korean commercial samples: introduction of a probiotic product. *Scientific Journal of Biological Sciences*. 1(6): 120-125.
- [2] Moraes P M, Perin L M, Júnior A S and Nero L A. 2013. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(1) 109-112.
- [3] Chakrabarti P, Das B K and Kapil A. 2009. Application of 16S rDNA based seminested PCR for diagnosis of acute bacterial meningitis. *Indian Journal of Medical Research* 129 (2) 182.
- [4] Choi H. J, Cheigh C. I, Kim S. B, Lee J. C, Lee D. W, Choi S. W, Park J. M, and Pyun Y. R. 2002. *Weissella kimchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 507-511.
- [5] Lee J. S, Lee K. C, Ahn J. S, Mheen T. I, Pyun Y. R, and Park Y. H. 2002. *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 1257-1261.
- [6] Lee J. S, Heo G. Y, Lee J. W, Oh Y. J, Park J. A, Park Y. H, Pyun Y. R, and Ahn J.S. 2005. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*. 102: 143-150.

- wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 6059-6069.
- [23] Kostinek, M., Specht, I., Edward, V. A., Schillinger, U., Hertel, C., Holzapfel, W.H., and Franz, C.M., 2005. Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 527-540.
- [24] Emerenini, E. C., Afolabi, O. R., Okolie, P. I., and Akintokun, A. K. 2013. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria Isolated from fresh fruits and vegetables using nested PCR analysis. *British Microbiology Research Journal*, 3(3): 368-377.
- [25] Sanchez, I., Sesenab, S., Poveda, J., and Cabezas, L. 2006. Genetic diversity, dynamics and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 107(3): 265-273.
- [26] Cho, J., Lee, D., Yang, C., Jeon, J., Kim, J., and Han, H. 2006. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product. *FEMS Microbiology Letters*, 257: 262-267.
- [27] Kim, M., and Chun, J. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 103: 91-96.
- [28] Bamforth, W. CH. 2005. *Food Fermentation and Microorganisms*. Blackwell Publishing company. London. pp 103-142.
- [29] Hutkins, W. R. 2001. Metabolism of Starter Cultures. In: *Applied Dairy Microbiology*. Marth, H. M., and Steele L. J. (Eds), Marsel Dekker. New York. pp 327-330.
- [30] Vasiee, AR, Tabatabaei-Yazdi F, Mortazavi A, Edalatian MR. 2014. Isolation, Identification and Characterization of Probiotic *Lactobacillus* spp. from Tarkhineh. *International Food Research Journal*. In Press.
- [15] Taheri, H.R., Moravej, H., Tabandeh, F., Zaghari, M., and Shivazad, M., 2009. Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. *Poultry Science*, 88(8):1586-1593.
- [16] Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Salminen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A. (Eds.), Marcel Dekker. New York. pp 19-86.
- [17] Patil, M. M., Pal, A., Anad, T., and Ramana, K. V. 2010. Isolation and characterization Lactic Acid Bacteria from curd and cucumber. *Indian Journal of Biotechnology*, 9: 166-172.
- [18] Schleifer, K. H. 2009. Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978. In: *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*. Volume Three. (2nd edition), Vos, D. P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., and Whitman, W. B., (Eds), Springer Dordrecht Heidelberg. New York. pp 464-654.
- [19] Tamang, J. P., Tamang, B., Schillinger, U., Franz, C. M. A. P., Gores, M., and Holzapfel, W.H. 2005. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, 105: 347-356.
- [20] Stiles, E. M., and Holzapfel, H. W. 1997. Lactic acid and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36:1-29.
- [21] Bjorkroth, K. J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel, W.H., Korkeala, H., and Vandamme, P., 2002. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(1):141-148.
- [22] De Vuyst, L., Schrijvers, V., Paramithiotis, S., Hoste, B., Vancanneyt, M., Swings, J., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., and Messens, W., 2002. The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional

2008. A genus-specific PCR method for differentiation between *Leuconostoc* and *Weissella* and its application in identification of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 286: 222–226.

[31] Giraffa, G., Andrighetto, C., and Antonella, C. 2004. Genotyping and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii*. *International Journal of Food Microbiology*, 91: 129-139.

[32] Schillinger, U., Boehringer, B., Wallbaum, S., Caroline, L., Gonfa, A., Huch, M., Holzapfel, W. H., and Franz, C. M. A. P.

Isolation and Identification of Lactic Microbiota from Kimchi, produced in Iran, based on Biochemical and Molecular Methods

Tabatabaei Yazdi, F.¹*, Vasiee, A. R.², Alizadeh Behbahani, B.²

1. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

2. Ph.D Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 93/5/17 Accepted: 93/7/1)

Kimchi is a general term for fermented vegetables. The aim of this study was to isolate and identify the Lactic Acid Bacteria involved in spontaneous fermentation of this product used biochemical and molecular methods. In this study, after successive culture on specific media, in order to classify of 85 selected isolates that according to preliminary experiments seemed Lactic Acid Bacteria, physiological and biochemical tests were done and then fermentation of 10 different carbohydrates were performed. Based on these tests, 85 isolates were divided into 10 groups. Some isolates were selected from each group and 16S rRNA was amplified using universal primers. Diversity of lactic acid bacteria in Kimchi was as followings: *Lactobacillus plantarum* (41.17%), *Lactobacillus fermentum* (9.41%), *Enterococcus faecalis* (3.52%), *Enterococcus faecium* (7.06%), *Leuconostoc citreum* (2.35%), *Leuconostoc mesenteroides* (3.52%), *Pediococcus pentosaceus* (8.23%), *Wissella cibaria* (24.70%). This fermented product has a wide microbial diversity which originates from natural microbiota presented in the raw vegetable. Lactic acid bacteria can produce a variety of acids and enzymes which play an important role in development of unique flavor and taste. Therefore, this strains that isolated from Kimchi can be used in the food industry.

Key words: Kimchi, Lactic flora, Biochemical tests, 16S rRNA

* Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir