شناسایی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از ماست های سنتی عشایر خراسان رضوی

رضا حاجی محمدی فریمانی[۱]، محمد باقر حبیبی نجفی[۲*]، بی بی صدیقه فضلی بزاز[۳]، محمد رضا عدالتیان[۴]، احمد رضا بهرامی[۵]

۱- دانشجوی دکترای تخصصی میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۵- استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۸)

چکیده

تلاش گسترده‌ای در سراسر دنیا به منظور مطالعه باکتری‌های اسید لاکتیک فرآورده های تخمیری سنتی از جمله ماست در جریان است تا بتوان از آن در جهت بهبود یا جایگزینی سویه‌های آغازگر تجاری موجود استفاده کرد. در این پژوهش، پنج نمونه ماست محلی از عشایر مناطق مختلف استان خراسان رضوی جمع آوری شد. گروه‌بندی و شناسایی جدایه‌ها بر اساس آزمون‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی (روش غیرمولکولی) و فناوری ARDRA و توالی‌یابی (روش ژنتیکی) صورت پذیرفت. در مجموع هفتاد و یکجدایه شامل ۳۳*استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و ۳۰ *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (زیرگونه های *بولگاریکوس* و *لاکتیس*) به عنوان جدایه های غالب در تمام نمونه های ماست به دست آمد. علاوه بر این هشت جدایه دیگر شامل *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*، *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* و *ویسلا سیباریا* نیز مشاهده گردید. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد نمونه‌های مختلف ماست از نظر ترکیب جمعیتباکتری‌های اسید لاکتیک با یکدیگر متفاوت می‌باشند.

کلید واژگان: فرآورده‌های لبنی سنتی،آغازگر، *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی*

*مسئول مکاتبات: habibi@um.ac.ir

۱- مقدمه

ماست یکی از محصولات پرطرف‌دار تخمیری در سرتاسر دنیا می‌باشد. گرچه شیر گاو مهم ترین منبع تولید صنعتی ماست است، قبایل بدوی در خاور میانه و آسیا از شیر گوسفند، بز، گاومیش[1] و گاو هیمالیایی[2] برای تولید ماست سنتی و محصولات شبیه به آن استفاده می‌کنند[۱]. تولید سنتی فرآورده‌های لبنی تخمیری مثل ماست همچنان در بسیاری از مناطق روستایی و عشایری کشور رایج می‌باشد.پژوهش‌های چندی پیرامون جمعیت میکروبی این محصولات صورت گرفته است[٤-۲]. با این حال، جدایه‌های حاصل از ماست‌های سنتی اغلب بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک (خصوصیات فنوتیپی) که برای گونه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک قابل اعتماد نمی‌باشند، شناسایی شده‌اند. تنها در یک مورد از روش‌های ژنوتیپی استفاده شده بود[٥].

تولید سنتی ماست بر میکروب‌های طبیعی موجود در شیر و استفاده از محصول روز قبل به عنوان مایه میکروبی مبتنی می‌باشد. نه تنها منشاء شیر، بلکه پیش‌تیمارهای مورد استفاده، شرایط تخمیر و فرآیندهای بعدی بر ترکیب جمعیت میکروبی و تغییرات آن در محصول نهایی اثر می‌گذارند [٦]. تولید صنعتی فرآورده‌های لبنی تخمیری با کیفیت ثابت نیازمند کاربرد آغازگرهای مشخص می‌باشد [۷]. به هر حال نتیجه مصرف مکرر شمار محدودی کشت میکروبی، تولید فرآورده‌هایی است که از نظر حسی فاقد تنوع می‌باشند. علاوه بر این، فرآیندهای تخمیری به حمله فاژها و غیر فعال شدن آغازگرها حساس‌اند که حاصل آن یک تخمیر ناموفق خواهد بود. بنابراین تلاش پیوسته‌ای برای جداسازی و شناسایی سویه‌های جدید آغازگر در جریان است[۸].چنین به نظر می‌رسد که سویه‌هایی از باکتری‌های اسید لاکتیک با خصوصیات مطلوب یا بدیع را بتوان در فرآورده‌های لبنی تخمیری سنتی و تهیه شده از شیر خام نظیر پنیر و ماست یافت[٦ و ۹].

این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک و مقایسه تفاوت‌های احتمالی ترکیب جمعیت میکروبی نمونه‌های مختلف ماست سنتی عشایر مناطق مختلف استان خراسان رضوی صورت پذیرفت. انتظار می‌رود حاصل این مطالعه معرفی سویه‌های جدیدی از باکتری‌های اسید لاکتیک به صنعت لبنیات باشد.

1. buffalo
2. yak

۲- مواد و روش

۲-۱- نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از ماست سنتی مناطق عشایری استان خراسان رضوی در فاصله پانزده اردیبهشت تا پانزده تیرماه ۱۳۹۲ انجام شد. مشاهدات مربوط به روش تولید نیز ثبت گردید. نمونه‌های ماست از دهنه آب کال کُندُر (شهرستان بردسکن)، روستای عشایری نُهور (شهرستان خواف)، ییلاق کنارخانه (حوزه روستای عشایری بهارکیش واقع در رشته کوه بینالود)، مرتع توماغ در رشته کوه هزار مسجد (شهرستان چناران) و تخته همزه کانلو (حد فاصل قوچان- باجگیران) تهیه شد. به منظور به حداقل رسیدن تغییرات فیزیکوشیمیایی و میکروبی، نمونه تا زمان انتقال به آزمایشگاه، در ظروف دربسته سترون و در شرایط تاریک و خنک (درون یخدان) نگهداری شد[۱۰].

۲-۲- جداسازی باکتری‌هایاسیدلاکتیک

مقدار ۱۰ گرم ماستدرون ۹۰ میلیلیتر بافر دی پتاسیم هیدروژن فسفات استریل (pH=7.5±0.2) رقیق شد (رقت $۱۰^{-۱}$)؛ رقیق سازی در رینگر تا رقت $۱۰^{-٦}$ صورت گرفت. از رقت‌های $۱۰^{-۲}$ تا $۱۰^{-٦}$ به مقدار یکدهم میلی لیتر به سطح محیط کشت MRS آگار و M17 آگار منتقل و به صورت هوازی/بی‌هوازی در دمای ۳۰ یا۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٢٤ تا حداکثر ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد[۱۱]. کلنی‌های کاتالاز منفی، گرم مثبت پس از سه بار کشت خطی پیاپی، به عنوان جدایه‌های خالص میکروبی در محیط کشت مشابه حاوی ۱۵٪ گلیسرول در دمای۸۰°C- ذخیره و نگهداری شدند.

گروه‌بندی بر اساس خصوصیات فیزیولوژیک

برای گروه‌بندی جدایه ها، رشد در دماهای مختلف (۱۵ و ٤٥ درجه سانتی‌گراد برای میله‌ای ها و ۱۰ و ٤٥ درجه سانتی‌گراد برای جدایه‌های کروی)، رشد در غلظت‌های مختلف نمک (۲، ٤ و ٦/٥ درصد) و تولید گاز از گلوکز بررسی شد[۱۲].

شناسایی بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی

تولید استوئین، هیدرولیز اسید هیپوریک، هیدرولیز بتا گالاکتوزیداز (اسکولین) و دیگر واکنش های مهم آنزیمی به همراه توانایی تخمیر برخی قندها و قندالکل ها برای شناسایی جدایه‌های کروی به کار رفت. برای شناسایی جدایه‌های میله‌ای، تخمیر قندهای مختلف و مشتقات آن بررسی شد. کلیه آزمون‌های فوق برای جدایه‌های کروی و میله‌ای به ترتیب با کمک دو کیت API 20Strep و API 50 CH (بیومریکس، فرانسه) انجام

شد. الگوی حاصل از واکنش های بیوشیمیایی و تخمیر قند برای ساخت درخت هومولوژی[3] به کار رفت.

استخراج DNA ژنومی تام

DNA ژنومی تام جدایه‌ها به کمک کیت (GeneEluteBacterial Genomic DNA Kit, Sigma-Aldrich, USA) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده، خالص و تا زمان مطالعات ژنومی در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

شناسایی مولکولی

شناسایی مولکولی جدایه‌ها، پس از تحلیل موفق الگوی ARDRA[4]، توالی یابی و در نهایت مقایسه ژن‌های 16S rRNA انجام شد.

تحلیل برش آنزیمی DNA ریبوزومی تکثیر یافته

ناحیه 16S rDNA جدایه‌ها براساس منطقه حفاظت شده ژن 16S rRNA پروکاریوت‌ها به کمک پرایمرهای 27FYM (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') و 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') تکثیر شد [۱۳]. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) در حجم ۵۰ میکرولیتر حاوی ۲۵ میکرولیتر MasterMix، هر یک از پرایمرهای پیش رو و پیرو ۱,۵ میکرولیتر، ۵ میکرولیتر DNA (تقریبا ۲۰۰ نانوگرم) و ۱۷ میکرولیتر آب با درجه مولکولی (سیگما، امریکا) اجرا شد. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه تکثیر (واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، و توسعه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه)، و توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه اجرا شد.

محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دو واکنش جداگانه به کمک آنزیم‌های برشی *Hae*III و *Hinf*I (EURX، لهستان) هضم شد. واکنش هضم در حجم ۱۰ میکرولیتر حاوی آنزیم و بافر مربوط، هر کدام یک میکرولیتر، محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به حجم ۵ میکرولیتر و مابقی آب با درجه مولکولی بود. محصولات واکنش هضم به کمک الکتروفورز و استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و شرایط ۷۵ ولت به مدت ۹۰ دقیقه از یکدیگر جدا شد. ژل‌ها در نهایت با اتیدیوم بروماید (۰,۵ میکروگرم بر میلی لیتر) رنگ‌آمیزی و تحت تابش ماوراءبنفش عکس‌برداری شد.

توالی‌یابی و مقایسه توالی‌های 16S rDNA

نماینده هر یک از انگشت‌نگاره‌های مختلف ARDRA انتخاب و محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با کیت (GenEluteTM PCR Clean-up kit, Sigma-Aldrich, USA) خالص و به کمک پرایمر 27FYM توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی) توالی‌یابی شد.توالی‌های به دست آمده با اندازه متوسط ۱۰۰۰ جفت باز با توالی‌های موجود در GenBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) مقایسه شدند.

تحلیل آماری

الگوهای به دست آمده از کیت های API با ضریب انطباق ساده[5] مقایسه شدند و با تحلیل ارتباط جفت گروه های بدون وزن (UPGMA)[6] خوشه سازی شد (Multi-variate Statistical Package program).

۳- نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک بر اساس آزمون های بیوشیمیایی و تخمیر قند

۷۱جدایه باکتری اسید لاکتیک از نمونه‌های ماست استخراج شد. این باکتری‌ها شامل۳۸جدایه حاصل از محیط کشت M17 و ۳۳ جدایه حاصل از محیط کشتMRS بودند کهاز نظر میکروسکوپی بررسی شدند و آنالیزهای بیوشیمیایی و ژنوتیپی روی آنها صورت پذیرفت. عمده کلنی های جدا شده از محیط کشت M17، کروی بودند حال آنکه جدایه‌های میله‌ای اغلب از محیط کشت MRS به دست آمدند. به هر حال تعدادی جدایه میله‌ای از محیط کشت M17 (۵ جدایه نمونه ماست توماغ) و شماری باکتری اسید لاکتیک کروی از محیط کشت MRS (۵جدایه) جدا شدند (جدول ۱). از آنجا که محیط کشت‌های M17 و MRS به ترتیب با pH های ۷/۲ و ۵/۷ نیمه انتخابی[7]می‌باشند، این نتایج قابل پیش‌بینی بود[۱۴ و ۱۵]. نتایج مشابهی توسط دیگر پژوهشگران گزارش شده است[۲۰-۱۶].

3. homology tree dendrogram
4. Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)

5. simple matching coefficient
6. unweighted pair groups average linkage analysis
7. elective

Table 1 Microbial species identified from M17 and MRS agar plates from the yogurt samples analyzed in this study

Total	Hamzeh		Tomagh		Kenar		Nohor		Kondor		Species
	M17	MRS	M17	MRS	M17	MRS	M17	MRS	M17	MRS	
۱۵	–	۲	–	–	–	۸	–	٤	–	۱	*L. delbrueckii subsp. bulgaricus*
۱۵	–	–	۵	۱۰	–	–	–	–	–	–	*L. delbrueckii subsp. lactis*
۳	–	۳	–	–	–	–	–	–	–	–	*L. helveticus*
۳۳	٤	–	٤	–	۱۳	–	۸	–	٤	–	*Streptococcus thermophilus*
۳	–	–	–	–	–	۳	–	–	–	–	*Pediococcus pentosaceus*
۲	–	–	–	–	–	–	–	۲	–	–	*Weissella cibaria*
۷۱	٤	۵	۹	۱۰	۱۳	۱۱	۸	٦	٤	۱	Total

تمام جدایه‌ها گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند و به خانوادهباکتری‌های اسید لاکتیک تعلق داشتند. علاوه بر این، اغلب جدایه‌ها از گلوکز گاز تولید نکردند و در دمای ٤٥°C قادر به رشد بودند حال آنکه در دمای۱۰°C (کروی‌ها) یا ۱۵°C(میله‌ای‌ها) قادر به رشد نبودند، که دلالت بر آن دارد که به گروه باکتری‌های اسید لاکتیک گرمادوست تعلق دارند. الگوی بیوشیمیایی جدایه‌های منتخب میله‌ای و کروی به ترتیب با کمک کیت‌های تجاری API50CH و API20Strep بررسی شدند. این بررسی‌ها نشان داد تفاوت قابل توجهی از نظر فعالیت‌های آنزیمی و الگوی تخمیر کربوهیدرات‌ها بین جدایه‌های مذکور وجود دارد.

به کمک کیتAPI20Strepدر مجموع ۱۰ الگوی مختلف بیوشیمیایی و تخمیر قند بینجدایه‌های کروی مشاهده گردید(شکل ۱- بالا). بر این اساس، اغلب جدایه‌های کروی به جنس *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* تعلق دارند. البته بر اساس نتایج کیت، این احتمال وجود دارد که جدایه‌های مذکور *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* باشند. دو باکتری یاد شده قادرند از لاکتوز به عنوان تنها منبع قندی استفاده کنند. در میان جدایه‌های کروی، چند *انتروکوکوس* نیز شناسایی شدند. جدایه‌های اخیر قادر به مصرف د-ریبوز، ال-آرابینوز، د-مانیتول، د-لاکتوز و د-ترهالوز بودند.

دهالگوی مختلف تخمیر کربوهیدرات بین جدایه های *لاکتوباسیلوس* مشاهده گردید (شکل ۱- پایین). هنگامی که الگوها از نظر آماری تحلیل شدند، از درجه بالای شباهت برخوردار بودند. اغلب جدایه‌های میله‌ای به جنس *لاکتوباسیلوس دلبروکی*زیرگونه *بولگاریکوس* یا *لاکتیس* تعلق داشتند. علاوه بر این تعدادی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نیز شناسایی شدند. با این حال نتایج شناسایی گونه اخیر چندان قطعی نبود و بر اساس نرم افزار، احتمال آنکه جدایه مورد نظر متعلق به گونه دیگری از جنس *لاکتوباسیلوس* باشد، وجود دارد. تمام جدایه‌های مورد بررسی قادر به مصرف د-لاکتوز بودند. د-ساکاروز و د-ترهالوز توسط زیرگونه های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مصرف شدند. بین جدایه‌ها، تنها باکتری قادر به هیدرولیز اسکولین، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بود. البته این احتمال وجود دارد کهتغییر رنگ احتمالی واکنش اسکولین به درستی تشخیص داده نشده باشد و به عبارت دیگر، واکنش اسکولین منفی بوده باشد.

سویه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* توانایی متفاوتی در مصرف د-گالاکتوز، د-گلوکز، د-فروکتوز و د-مانوز داشتند. جدایه ماست نهور، قادر به تخمیر سه قند د-گلوکز، د-فروکتوز و د-مانوز بود. نظر به مصرف د-گالاکتوز و د-گلوکز، جدایه حاصل از ماست همزه کانلو بهترین توانایی کاهش pH بین کلیه جدایه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه

بولگاریکوس دارا بودند. به عبارت دیگر، اگر هدف تولید ماستی با طعم ملایم و نه چندان اسیدی باشد، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* حاصل از ماست‌های کندر و کنارخانه توصیه می‌شوند زیرا جدایه‌های مذکور در حالی که توانایی تخمیر قند لاکتوز را دارند، فاقد توانایی تخمیر قند د-گالاکتوز و د-گلوکز می‌باشند.

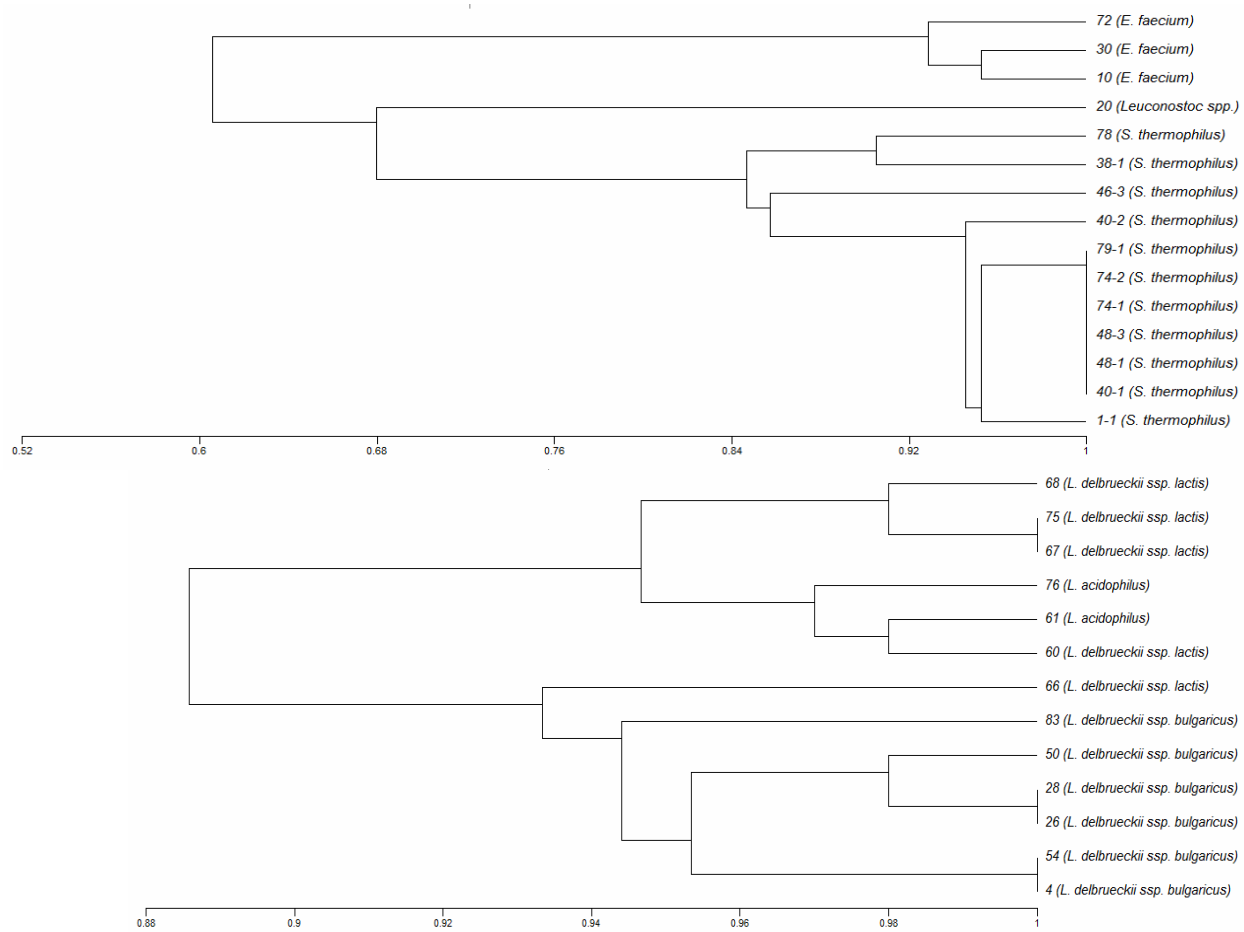

Fig 1 Homology tree dendrogram of the carbohydrate fermentation profiles obtained for cocci isolates (above) and rod isolates (bottom). Vertical lines of the dendrogram represent the degree of similarity shared by the groups connected by the lines.

شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک بر اساس روش‌های مولکولی

محصول تکثیر ژن‌های کد کننده 16S rRNA به کمک آنزیم های برش دهنده *Hae*III و *Hinf*I هضم شد. سهالگوی متمایز ARDRA به کمک *Hae*III و *Hinf*I بین جدایه‌های کوکسی مشاهده شد؛ حال آنکه تنها دوالگوی متفاوت میان جدایه‌های میله‌ای مشاهده گردید (شکل۲). پس از توالی‌یابی و مقایسه توالی‌ها، تمام الگوها به گونه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک تعلق داشتند (جدول ۱).جدایه‌های کروی به عنوان *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* (۳۳جدایه)، *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* (۳جدایه)،*ویسلا سیباریا*(۲جدایه)شناسایی شدند. *لاکتوباسیلوس*های شناسایی شده به گونه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (۳۰جدایه) و*لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* (۳ جدایه) تعلق داشتند.نیمی از ۳۰ جدایه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* به زیرگونه *بولگاریکوس* تعلق داشتند و مابقی زیرگونه *لاکتیس* بودند (جدول ۱).

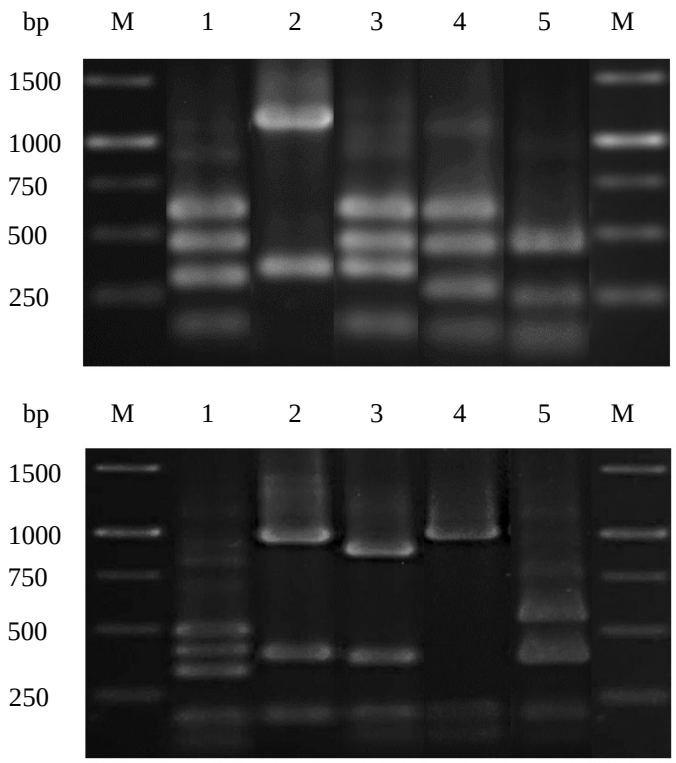

Fig 2 ARDRA profiles of cocci (**a**) and bacilli (**b**) isolates with the restriction enzymes HaeIII (above) and HinfI (*bottom*). Order **a** 1, *S. thermophilus*; 2, *W. cibaria*; 3, *P. pentosaceus*; 4, *L. delbrueckii*; 5, *L. helveticus*. and molecular weight marker (*M)*

مقایسه دو آنزیم *Hae*III و *Hinf*I نشان داد، آنزیم *Hinf*I توانایی بهتری در ایجاد تمایز بین *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و سایر باکتری‌های اسید لاکتیک کروی ایجاد می‌کند. به صورت مشابه، آنزیم اخیر در ایجاد تفاوت بین *لاکتوباسیلوس دلبروکی* با سایر جنس و گونه‌های *لاکتوباسیلوس*از قابلیت بیشتری برخوردار است.

عدم اطمینان به شناسایی فنوتیپی باکتری‌های اسید لاکتیک [۲۱ و ۲۲]، استفاده از روش‌های شناسایی مولکولی را امری ضروری می‌سازد. بر اساس روش‌های مولکولی به کار رفته در این پژوهش، بیشترین جمعیت میکروبی ماست به دو باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* تعلق داشت.جدایه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی*شامل دو زیرگونه *بولگاریکوس* و *لاکتیس* بودند که ماست توماغ به تمامی حاوی زیرگونه *لاکتیس* بود؛حال آنکه سایر نمونه‌ها تنها دارای زیرگونه *بولگاریکوس* بودند. بر اساس استاندارد کدکس ۲۰۰۳-۲۴۳آغازگر ماست از دو گونه*استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه *بولگاریکوس* یا در حالت کلی *لاکتوباسیلوس*تشکیل شده است[۲۳]. زیرگونه *لاکتیس* از نظر فنوتیپی و تکنولوژیک شباهت بسیاری به زیرگونه *بولگاریکوس* دارد که شامل توانایی تخمیر لاکتوز و تولید اسید، عدم تولید گاز از گلوکز (هموفرمنتاتیو) و توانایی رشد در دمای بالا به عنوان یک باکتری گرمادوست است[۱۲].

شناسایی *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و زیرگونه‌های آن در یک فرآورده لبنی با صرف اتکا به روش‌های فنوتیپی دشوار می‌باشد و حتی گاه به اشتباه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* یا *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* شناسایی می‌شود. بنابراین به کارگیری روش‌های ژنتیکی به تنهایی یا در ترکیب با روش های فنوتیپی ضروری می‌باشد[۲۶-۲۴].در این پژوهش، بر اساس روش‌های مولکولی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بین جدایه‌ها شناسایی نگردید. چنین به نظر می‌رسد که واکنش تولید اسکولین به دلیل خطای تشخیص رنگ، به غلط مثبت گزارش شده است. این موضوع با نظر به اینکه قرائت کیت‌های API صرفا مبتنی بر

رنگ‌سنجی و توانایی تشخیص و تمایز رنگ توسط فرد آزمون‌گر است، اعتماد به نتایج آزمون های بیوشیمیایی را زیر سوال می‌برد. در ارتباط با عدم تطابق پاسخ کیت‌ها با نتایج روش‌های ژنتیکی، موارد مشابهی توسط سایر پژوهشگران گزارش شده است [۲۷]. بررسی توانایی تولید لخته در شیر (داده ها ارائه نشده است) نیز نشان داد زیرگونه *لاکتیس* به خوبی می‌تواند لخته همگن و یکدست در شیر ایجاد کند. بنابراین استفاده از این زیرگونه به همراه *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* به عنوان یک آغازگر جدید پیشنهاد می‌گردد.

مطالعات پیشین نشان می‌دهد *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* بازیرگونه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* در ماست و محصولات مشابه همراه می‌باشد[۳۰-۲۸]. تعدادی جدایه مزوفیل (*پدیوکوکوس پنتوزاسئوس،ویسلا سیباریا*) در نمونه‌های ماست نیز مشاهده شد که وجود آنها می‌تواند به علت عدم حرارت‌دهی بالای شیر مورد استفاده در تولید ماست (نهور) یا آلودگی محیطی (ماست کنارخانه) باشد.

در ماست همزه کانلو علاوه بر دو باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، تعدادی *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* نیز شناسایی شد. باکتری اخیر همانند *لاکتوباسیلوس دلبروکی* به گروه ترموباکتریوم‌ها تعلق دارد. به عبارت دیگر هموفرمنتاتیو و گرمادوست است [۱۲].*استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* جزو گروه باکتری‌های اسید لاکتیک گرمادوست می‌باشند که آغازگرهای مهمی در صنعت لبنی محسوب می‌شوند [۳۱]. با شناسایی سویه‌های جدید از محصولات سنتی می‌توان از آنها به عنوان مکمل یا جایگزین آغازگرهای گرمادوست جاری، استفاده کرد [۳۴-۳۲].

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش پنج نمونه ماست عشایر استان خراسان رضوی از نظر وجود باکتری‌های اسید لاکتیک بررسی شد. دو باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، باکتری‌های غالب ماست بودند. بررسی الگوی تخمیر قند باکتری‌های مورد مطالعه در این تحقیق نشان داد تنوع فنوتیپی قابل توجهی بینجدایه‌هاینمونه‌های مختلف ماست وجود دارد. به منظور معرفی این سویه‌ها و کاربرد آن در صنعت لبنیات، مطالعات تکنولوژیک نظیر تولید آروما، اگزوپلی‌ساکارید و توانایی مقاومت در برابر استرس ها نیز پیشنهاد میشود. کاربرد جدایه‌های فوق ضمن کمک بهاصالت فرآورده‌های لبنی ایرانی، در حفظ ذخایر ژنتیکی کشور موثر می‌باشد.

۵- سپاسگزاری

از آقای صالح، کارشناس دفتر مطالعات اداره کل امور عشایر استان خراسان رضوی و آقای نوشادی، رئیس شرکت تعاونی عشایر مشهد به دلیل ارائه اطلاعات مفید در مورد عشایر استان و نیز آقای مهندس قشقایی، رئیس اداره امور عشایر قوچان و آقایان دامن باغ و یوسفی مقدم، کارکنان شرکت تعاونی عشایر خواف که همکاری بسیار خوبی در فراهم نمودن امکان سفر به مناطق عشایری و نمونه‌برداری داشتند و همچنین از حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور، قدردانی می‌شود.

۶- منابع

[1] Tamime, A. Y., and Robinson, R. K. (2007). *Yoghurt: Science and Technology*. 3rd Ed. Woodhead Publishing. Cambridge, UK.

[2] Azadnia, P., Shah Ahmad Ghasemi, M., Davanian Mohaghegh, M., Karimi Jashni, M., Zamani, M.H., Khalegh Babaki, A. and Taarof, N. 2011. Isolation and Identification of Lactococci from Traditional Yoghurt in Tribes of Kazerun. Journal of Animal and Veterinary Advances 10 (6): 698-700.

[3] Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H., Mojgani, N., Karimi Torshizi, M.A., Aminafshar, M., and Mohamadi, M. 2012. Isolation of Lactic Acid Bacteria from Ewe Milk, Traditional Yoghurt and Sour Buttermilk in Iran. European Journal of Food Research & Review. 2(3): 79-92.

[4] Pourahmad, R. and Mazaheri Assadi, M. 2005. Yoghurt production by Iranian native starter cultures. Nutrition & Food Science, 35 (6) 410 – 415.

[5] Tafvizi, F. and Tajabadi Ebrahimi, M. 2012. Detection of genetic diversity and classification of *Lactobacillus* species isolated from Iranian traditional dairy products by RAPD fingerprinting and POPGENE analysis. Annals of Biological Research, 3 (10) 4904-4911.

[6] Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, S. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. Int. Dairy J. 12, 91-109.

[7] Parente, E. Cogan, T.M. (2004). Starter cultures: general aspects. In, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3rd ed. Vol. 1. *General Aspects*. P.F. Fox., P.J. H. McSweeney, T. M. Cogan, and T. P. Guninee (Eds.). Elsevier, Amsterdam. p. 123-147.

[8] Mahony, J., Ainsworth, S., Stockdale, S., and van Sinderen, D. 2012. Phages of lactic acid bacteria: the role of genetics in understanding phage-host interactions and their co-evolutionary processes. Virology 434, 143–150.

[9] Jensen, M.P., Ardo, Y., and Vogensen, F.K., 2009. Isolation of cultivable thermophilic LAB from cheeses made with mesophilic starter and molecular comparison with dairy-related *Lactobacillus helveticus* strains. Letter in Applied Microbiology 49, 396-402.

[10] Anon. 2009. Milk and milk products-guidance on sampling. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, ISIRI no. 326.

[11] Anon. 2004. Enumeration of characteristic microorganisms- colony count technique at 37°C. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, ISIRI no. 7714.

[12] Harrigan, W.F. 1998. Laboratory methods in food microbiology. Academic Press. London, UK.

[13] Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (January 1991). "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study". *J Bacteriol.*173 (2): 697–703.

[14] Reuter, G. 1985. Elective and selective media for lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology 2, 55-68.

[15] Schillinger, U., and Holzapfel, W.H. 2003. Culture media for lactic acid bacteria. In,*Handbook of Culture Media for Food Microbiology*. Corry, J. E. L., Curtis, G.D.W., and Baird, R.M. Elsevier Science, Amsterdam. pp. 128-130.

[16] Edalatian, M.R., Habibi Najafi, M.B., Mortazavi, A. Mayo, B. 2012. The biodiversity and evolution of lactic flora during ripening of the Iranian semisoft Lighvan cheese. International Journal of Dairy Technology. 65 (1) 81-89.

[17] Gemelas, L., Rigobello, V., Ly-Chatain, M. H., and Demarigny, Y. 2013. Selective *Lactococcus* enumeration in raw milk. Food and Nutrition Science 4, 49-58.

[18] Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Pelaez, and Requena, T. (2007). Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus, L. acidophilus, L. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. International Dairy journal, 17: 1107-1114.

[19] Tharmaraj, N., Shah, N.P. 2003. Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. J. Dairy Sci. 86:2288–2296

[20] Vinderola, C.G.; Reinheimer, J.A. 1999. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and Lactobacillus acidophilus in the presence of yoghurt bacteria. Int. Dairy J., 9(8), p.497-505.

[21] Holt, J. G., Sneath, P. H., Krieg, N. R., and Holt, J. G. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Ed. Williams & Wilkins, Lippincott, USA.

[22] Johansson, M-L. Sanni, A., Lonner, C., Molin, G. 1995. Phenotypically based taxonomy using API 50CH of lactobacilli from Nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. International Journal of Food Microbiology 25: 159-168

[23] FAO/WHO. 2010. Fermented milks. Codex Standard 243-2003. 2nd Ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Rome.

[24] Germond, J.E., Lapierre, L., Delley, M., Mollet, B., Felis, G.E., Dellaglio, F., 2003. Evolution of the bacterial species *Lactobacillus delbrueckii*: a partial genomic

study with reflections on prokaryotic species concept. Mol. Biol. Evol. 20, 93-104.

[25] Giraffa G, Andrighetto C, Antonello C, Gatti M, Lazzi C, Marcazzan G, Lombardi A, Neviani E. 2004. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains of dairy origin. Int J Food Microbiol. 91, 129-139.

[26] Giraffa G, Paris A, Valcavi L, Gatti M, Neviani E. 2001. Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. J Appl Microbiol. 91, 937-943.

[27] Edalatian, M.R. 2011. Identification and characterization of lactic flora of Iranian raw milk cheeses using cultural and molecular methods. Thesis. Ferdowsi university of Mashhad

[28] El-Baradei, G., A. Delacroix-Buchet, and J. C. Ogier. 2008. Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *International Journal of Food Microbiology* 121:295-301.

[29] Tamang, J. P. 2009. *Himalayan Fermented Foods: Microbiology, Nutrition and Ethnic Values.* New York: CRC Press, (in press). ISBN: 9781420093247.

[30] Xanthopoulos, V., Petridis, D. and Tzanetakis, N. (2001) Characterization and classification of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strains isolated from traditional Greek yoghurts. Journal of Food Science 66, 747-752.

[31] Mills S., O'Sullivan O., Hill C., Fitzgerald G.F., Ross R.P. 2010. The changing face of dairy starter cultures research. From genomics to economics. Int. J. Dairy Technol. 63:149-170.

[32] Hebert, E. M., Raya, R. R., Tailliez, P., and de Giori, G. S. (2000). Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. International Journal of Food Microbiology, 59: 19-27.

[33] Mora, D., Fortina, M. G., Parini, C., Ricci, G., Gatti, M., Giraffa, G., Manachini, P. L., (2002). Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. Journal of Applied Microbiology 93, 278-287.

[34] Rossetti, L., Fornassi, M. E., Gatti, M., Lazzi, C., Neviani, E., Giraffa, G. (2008). Grana Padano cheese whey starters: microbial composition and strain distribution. International Journal of Food Microbiology 127, 168-171.

Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional yoghurts of Khorasan-e-Razavi

Hajimohammadi Farimani, R.[1], Habibi Najafi, M. B. [2*], Fazly Bazzaz, B. S. [3], Edalatian, M. R.[4], Bahrami, A. R.[5]

1. PhD student of Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3. Professor,Biotechnology Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences
4. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
5. Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 94/3/30 Accepted: 94/6/8)

There is a global interest to study lactic acid bacteria (LAB) of artisanal fermented products like yoghurt for improving or replacing current strains used in commercial starter cultures. In this work, five traditional yoghurt samples were collected from different areas of Khorasan-e-Razavi. Grouping and identification of isolates were carried out on the basis of physiological and biochemical tests (non-molecular),as well as ARDRA technique and sequencing (molecular methods). Totally, 71 isolates including 33 *Streptococcus thermophilus*, 30 *Lactobacillus delbrueckii* (subsp. *Bulgaricus* and *lactis*), were identified as dominant strains in all yoghurt samples. Also 8 other isolates belonging to *Lactobacillus helveticus*, *Pediococcus pentosaceus* and *Weissella cibaria* were observed. Results of this research show the diversity of LAB population in collected samples.

Key word: Traditional dairy products, Starter, *Streptococcus thermophiles*, *Lactobacillus delbrueckii*

*Correspong Author E-mail Adress: habibi@um.ac.ir