جداسازی، شناسایی مولکولی و ارزیابی ایمنی باکتری های اسید لاکتیک پروتئولیتیک به دست آمده از نمونه‌های مختلف شیر خام

علی مویدی[۱*]، ماندانا محمودی[۲]، مرتضی خمیری[۳]، شهرام لقمان[۴]

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان، ایران
۲- دانش‌آموخته دکتری ، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان، ایران
۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران .
٤- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۲٦ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۰٤)

چکیده

برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در شیر خام به‌ویژه انواع پروتئولیتیک، خصوصیات تکنولوژیک مفیدی دارند و نقش مهمی در توسعه ویژگی‌های محصول نهایی بازی می‌کنند، اما غالبا در طی فرآوری از بین می‌روند. از این رو، جداسازی و نگهداری آنها به منظور کاربردهای بعدی ارزشمند خواهد بود. در این پژوهش، پس از جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در شیر خام گاو، گوسفند و بز بر روی محیط‌های کشت MRS agar و M17 agar، جدایه‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی انتخاب شده و از نظر فعالیت پروتئولیتیکی روی محیط Skim milk agar غربال شدند. جدایه‌های دارای فعالیت پروتئولیتیکی مناسب با استفاده از توالی‌یابی قطعه ژنی 16S rDNA شناسایی شدند و فعالیت همولیزی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها در برابر ۱۰ آنتی بیوتیک رایج مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز توالی‌یابی با برنامه BLAST منجر به شناسایی *Lactobacillus delbruekii* (۵ جدایه)، *L. delbruekii* زیرگونه bulgaricus، *L. fermentum*، *L. reuteri*، *L. curvatus*، *Lactococcus lactis* زیرگونه *lactis*، و *Streptococcus lutetiensis* شد. از میان جدایه‌های شناسایی شده، *L. lactis* زیرگونه *lactis* پس از ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ایجاد قطر هاله ۲۳ میلی‌متر بیشترین فعالیت پروتئولیزی را نشان داد. در مورد فعالیت همولیزی، فقط *Lactobacillus fermentum* فعالیت آلفا-همولیزی نشان داد و سایر باکتری‌ها غیرهمولیتیک بودند. تمام جدایه‌های شناسایی‌شده به تتراسایکلین، آمپی‌سیلین، اریترومایسن، ونکومایسین و جنتامایسین حساس بودند به‌جز *L. reuteri* و *Lactococcus lactis* زیرگونه *lactis* که به ترتیب به ونکومایسین و جنتامایسن مقاوم بودند. در مورد مقاومت به پنی‌سیلین، کلرآمفنیکول، کلیندامایسین، کانامایسین و استرپتومایسین نتایج بسته به نژاد مورد بررسی متفاوت بود. نتایج این پروژه، نشان‌دهنده تنوع نژادهای باکتری‌های اسید لاکتیک پروتئولیتیک در شیر خام است. به علاوه، اگرچه باکتری‌های اسید لاکتیک ایمن در نظر گرفته می‌شوند و در لیست GRAS قرار دارند، اما نژادهای وحشی جداسازی‌شده از شیر خام باید از نظر جنبه‌های مرتبط با ایمنی مورد بررسی قرار گیرند.

کلید واژگان: باکتری‌های اسید لاکتیک، شیر خام، فعالیت پروتئولیتیکی، ایمنی

* مسئول مکاتبات: amoayedi1984@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-10]

۱- مقدمه

باکتری‌های اسید لاکتیک گروه هتروژنی از باکتری‌های گرم مثبت، غیر اسپورزا، کاتالاز منفی و بی‌هوازی اختیاری هستند که از دیدگاه بیوتکنولوژی پتانسیل بالایی در تولید مواد غذایی به‌ویژه فرآورده‌های لبنی تخمیر شده دارند [۱]. محققان زیادی به شناسایی و بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی و عملکردی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از مواد غذایی تخمیری سنتی پرداخته‌اند [٤-۲]. آسپری و همکاران (۲۰۱۷)، تنوع، جنبه‌های تکنولوژیک و ایمنی و پتانسیل پروبیوتیکی *Enterococcus* های جداشده از شیر الاغ را بررسی کردند. این مطالعه نشان داد که عمده آنها به آنتی‌بیوتیک‌های درمانی مهم (از جمله ونکومایسین) حساس بوده و در اندکی از جدایه‌ها ژن‌های تهاجمی وجود دارد [۵]. بررسی ویژگی‌های تکنولوژیک *Lactococcus* ها و *Enterococcus* های مولد باکتریوسین که از شیر خام بز جداسازی شده بودند نشان داد که *Lactococcus lactis* زیرگونه *lactis* و سه نژاد *Enterococcus faecalis* فعالیت پروتئولیتیکی بالایی دارند [٦].

در فرآیندهای تخمیری شیر، سیستم پروتئولیتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک نقش کلیدی ایفا می‌کند زیرا این سیستم، باکتری‌ها را قادر می‌سازد تا با غلبه بر کمبود اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدها در شیر رشد کنند و تخمیر انجام دهند [۷]. سیستم پروتئولیتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک حاوی پروتئیناز متصل به دیواره سلولی و چندین پپتیداز داخل سلولی است [۸]. پروتئینازهای این گروه از باکتری‌ها از جمله پروتئینازهای *Lactococcus lactis*، الیگوپپتیدهای فعال بیولوژیک از α وβ -کازئین‌ها تولید می‌کنند که فعالیت‌های متعددی از جمله تعدیل سیستم ایمنی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد سرطانی و مهار آنزیم مبدل آنژیوتنسین دارند [۷، ۹].

شیر خام دارای تنوع گسترده‌ای از باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد که ثابت شده است برخی از آنها ویژگی‌های مطلوبی در تولید محصولات لبنی تخمیری به‌ویژه پنیر دارند [۱۰]. شرایط تولید، فصل و گونه دام می‌تواند فراوانی و تنوع زیستی باکتری-های اسید لاکتیک شیر خام را تحت تاثیر قرار دهد ضمن اینکه خصوصیات باکتری‌های جداشده نیز متفاوت می‌باشد. به‌طور مثال دیده شده است که تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک دارای خاصیت ضدقارچی در شیر گاو بسیار بیشتر از شیر گوسفند بوده است [۱۱]. مطالعات قبلی تنوع زیستی باکتری‌های اسید لاکتیک شیر خام گوسفند، گاو و بز را نشان می‌دهند [۱۲]. محققان طی مطالعه تنوع زیستی به کمک تکنیک RAPD-PCR و بررسی پتانسیل تکنولوژیکی باکتری‌های اسید لاکتیک وحشی جداشده از شیر خام گاو مشاهده کردند که لاکتوکوکوس، انتروکوکوس و استرپتوکوکوس در شیر خام گاو غالب بود در حالی که لاکتوباسیلوس‌ها، لوکونوستوک‌ها و پدیوکوکوس‌ها در مقادیر کم یافت شدند [۱۰].

امروزه بخش عمده‌ای از فرآورده‌های لبنی تخمیرشده با استفاده از کشت‌های آغازگر شناخته شده تولید می‌شوند که یکی از اهداف اصلی استفاده از این کشت‌ها، اسیدی کردن سریع محیط شیر است. به‌دنبال اسیدی شدن سریع محیط شیر، باکتری‌های اسید لاکتیک طبیعی شیر از بین می‌روند [۱۰]. علاوه بر این به-دنبال فرآیندهای سالم‌سازی شیر (پاستوریزاسیون) نیز بخش عمده‌ای از باکتری‌های اسید لاکتیک از بین می‌روند. این در حالی است که باکتری‌های اسید لاکتیک طبیعی شیر خام پتانسیل بالایی در فرایند پروتئولیز، تولید باکتریوسین، فعالیت ضد قارچی و ... دارند و در صورت استفاده به عنوان کشت‌های کمکی می‌توانند در تولید محصولی با کیفیت بالا و ویژگی‌های سلامتی‌بخش مثبت واقع شوند [۱۳].

با توجه به تنوع نژادهای وحشی باکتری‌های اسید لاکتیک و امکان یافتن نژادهای جدید با ویژگی‌های پروبیوتیکی و عملکردی بالقوه از مواد غذایی تخمیری سنتی و نیز وارداتی بودن آغازگرهای مورد استفاده در صنعت لبنیات کشورمان، جداسازی و شناسایی این باکتری‌ها از منابع سنتی جهت تولید محصولات لبنی ضروری به نظر می‌رسد. در این راستا فرقانی و همکاران (۱۳۸۹) تنوع ارزشمندی از باکتری های اسید لاکتیک را در شیر خام گاو در البرز مرکزی یافتند. گزارش داده شد که تقریبا همه جدایه‌ها کاربرد صنعتی داشته و می‌توانند جایگزین سویه‌های وارداتی شوند [١٤].

در اغلب مطالعات، باکتری های اسید لاکتیک از فرآورده‌های تهیه شده از شیرخام جداسازی و شناسایی شده‌اند اما در ارتباط

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-10]

با باکتری‌های اسید لاکتیک شیر خام، مطالعات اندک است. جداسازی باکتری‌های لاکتیکی از شیر خام در مقایسه با جداسازی از محصولاتی مانند پنیر رسیده، این مزیت را دارد که امکان انتخاب بهتری از باکتری‌های اسید لاکتیک در سطح گونه و نژاد فراهم می‌شود [۱۰]. نظر به اهمیت فعالیت گونه‌های میکروبی پروتئولیتیک، این پژوهش با هدف جداسازی باکتری-های اسید لاکتیک پروتئولیتیک از نمونه‌های مختلف شیر خام و بررسی تنوع و فراوانی آنها صورت گرفت. همچنین برخی جنبه-های ایمنی آن‌ها از جمله فعالیت همولیتیک و مقاومت آنتی-بیوتیکی جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- محیط‌های کشت، مواد شیمیایی و مواد ژنتیکی مورد استفاده

محیط‌های کشت MRS agar، M17 agar، Skim milk agar، Blood agar، و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از جمله گلیسرول، هیدروکسید سدیم و ... از شرکت مرک آلمان تهیه شد. دیسک‌های آنتی بیوتیک از شرکت پادتن طب ایران، کیت استخراج DNA از شرکت یکتا تجهیز آزما (ایران)، مستر میکس و آغازگرهای مورد استفاده در شناسایی ژنتیکی از شرکت ماکروژن (کره جنوبی) خریداری شدند.

۲-۲- جمع‌آوری نمونه‌ها و جداسازی اولیه

نمونه‌های شیر خام گاو، گوسفند و بز از شهرستان گرگان جمع-آوری و در ظروف استریل و درون جعبه‌های حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل و در همان روز جهت جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک استفاده شدند. جهت جداسازی، ۱۰۰ میکرولیتر شیر خام اولیه و ۱۰۰ میکرولیتر شیر رقیق شده (با غلظت ۰/۱ نمونه اصلی) به‌صورت جداگانه روی محیط‌های MRS agar و M17 agar کشت سطحی داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت جداسازی باکتری-های اسید لاکتیک مزوفیل و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴۶ درجه سانتی‌گراد جهت جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک ترموفیل تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از گازپک گرمخانه-گذاری شدند. تک کلنی‌های رشدیافته روی پلیت آگار بر اساس ویژگی‌های ظاهری متمایز شدند، هر کلنی به صورت جداگانه در پلیت‌های جدید حاوی محیط کشت مربوطه (MRS agar یا M17 agar) کشت داده شد و تحت شرایط بی‌هوازی در دمای مورد نظر گرمخانه‌گذاری گردید. سپس کلنی‌های خالص رشد یافته روی پلیت آگار در مراحل اولیه با رنگ‌آمیزی گرم و فعالیت کاتالازی از یکدیگر متمایز شدند. جدایه‌هایی که در رنگ آمیزی گرم، مثبت و از نظر فعالیت کاتالازی، منفی بودند به منظور بررسی فعالیت پروتئولیتیکی و شناسایی مولکولی تا سطح گونه انتخاب شدند. برای نگهداری کوتاه مدت جدایه‌ها از محیط کشت MRS آگار و M17 آگار در لوله شیب‌دار استفاده شد. جهت تهیه کلکسیون و نگهداری طولانی مدت، از محیط کشت MRS و گلیسرول ۴۰ درصد استفاده گردید و پس از انتقال به لوله‌های استریل ۲ میلی‌لیتری مخصوص درپوش دار در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد و نگهداری شد [۲].

۲-۳- تعیین فعالیت پروتئولیتیکی جدایه‌ها

فعالیت پروتئولیتیکی جدایه‌ها به روش چاهک و با استفاده از محیط کشت Skim milk agar بررسی شد. بدین منظور، چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر در محیط کشت ایجاد گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه ۱۶-۱۲ ساعته (در فاز لگاریتمی) هر یک از جدایه‌ها به چاهک‌ها تزریق شد. سپس پلیت‌ها به مدت یک ساعت در دمای محیط نگهداشته شدند تا انتشار باکتری به خوبی در محیط کشت انجام شود. پس از آن، پلیت‌ها گرمخانه-گذاری شدند. قطر هاله پس از ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد [۱].

۲-۴- شناسایی جدایه‌ها به روش مولکولی

۲-۴-۱- استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

استخراج DNA به کمک کیت تجاری استخراج DNA، بر اساس دستورالعمل کیت مورد استفاده انجام شد. DNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت شناسایی مولکولی باکتری‌های اسید لاکتیک به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، از آغازگرهای عمومی رفت و برگشت باکتری‌های اسید لاکتیک، برای تکثیر قطعه‌ای از ژن S ۱۶rDNA استفاده شد. توالی آغازگرها عبارت بودند از

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-10]

1492R: 5´-GGTTACCTTGTTACGACTT-3´ و 27F: 5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´. طول قطعه DNA تکثیر شده ۱۵۰۰bp بود. واکنش PCR در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر و با برنامه دمایی مشابه با روش توصیف شده توسط لیت و همکاران (۲۰۱۵) انجام گرفت [۱۵]. جهت آنالیز کیفی واکنش PCR، محصولات تکثیر شده توسط ترموسایکلر، روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند و در مقایسه با مارکر DNA طول قطعه ژنی تعیین گردید [۱۵].

۲-٤-۲- تعیین توالی و مقایسه توالی‌ها

جهت تعیین توالی، محصولات واکنش PCR پس از خالص سازی به شرکت ماکروژن در کره جنوبی ارسال شدند. توالی‌های بدست آمده با کمک برنامه BLAST با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن (NCBI) مقایسه شدند. جدایه‌هایی که توالی آن‌ها با موارد موجود در بانک اطلاعاتی، درصد مشابهت بالاتری نشان دادند به عنوان همان گونه شناسایی شدند.

۲-۵- فعالیت همولیتیکی

تولید همولیزین توسط جدایه‌ها بر روی محیط کشت Blood agar حاوی ۵ درصد خون گوسفند بررسی شد. برای این منظور، باکتری‌های فعال بصورت خطی روی پلیت کشت داده شدند و پس از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری مورد بررسی قرار گرفتند. پیدایش هاله‌های روشن یا سبز به ترتیب به عنوان فعالیت بتاهمولیتیک یا آلفاهمولیتیک گزارش شد. لازم به ذکر است از *E. coli* به عنوان باکتری کنترل مثبت استفاده شد [۲].

۲-٦- تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج با روش انتشار دیسک آنتی‌بیوتیک‌های مربوطه ارزیابی شد. جهت این کار، ابتدا جدایه‌های مختلف در محیط MRS مایع در ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از کشت فعال روی محیط MRS آگار کشت سطحی داده شد. در مرحله بعد، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به کمک پنس استریل روی سطح محیط آگاردار مذکور قرار داده شدند و پلیت‌ها تحت شرایط بی‌هوازی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. دیسک‌های آنتی-بیوتیک حاوی غلظت‌های ۳۰ میکروگرم (کلرآمفنیکول، کانامایسین، ونکومایسین، اریترومایسین، تتراسایکلین)، ۱۰ میکروگرم (آمپی‌سیلین، پنی‌سیلین، استرپتومایسین و جنتامایسین) و ۲ میکروگرم (کلیندامایسین) بودند. پس از گذشت ۲٤ ساعت، قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. نتایج بر اساس CLSI (۲۰۱۳) به صورت حساس، نیمه‌حساس و مقاوم گزارش شد [۱٦].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- جداسازی باکتری های اسید لاکتیک و بررسی فعالیت پروتئولیتیکی آن‌ها

در مجموع ۳۰ کلنی متفاوت در پلیت‌های کشت شناسایی و پس از خالص سازی از نظر فعالیت کاتالازی بررسی شدند. از این تعداد ۱۵ جدایه کاتالاز منفی بودند که جهت بررسی‌های بیشتر (رنگ‌آمیزی گرم) و فعالیت پروتئولیزی انتخاب شدند. در رنگ-آمیزی گرم تمام جدایه‌ها گرم مثبت و شامل مورفولوژی‌های گوناگون میله‌ای بلند، میله‌ای کوتاه، بیضی شکل، کروی و .... بودند. فعالیت پروتئولیتیکی ۱۵ جدایه کاتالاز منفی و گرم مثبت با اندازه‌گیری قطر هاله اطراف چاهک در پلیت Skim milk agar و مقایسه آنها بررسی شد (جدول ۱). همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود جدایه با کد BRM3 جداسازی شده از شیر خام گاو بالاترین فعالیت پروتئولیتیک را در محیط skim milk agar نشان داد. در حالی که جدایه با کد SRM3 جداسازی شده از شیر خام گوسفند کمترین فعالیت پروتئولیزی را داشت. لازم به ذکر است جدایه با کد BRM2 اگرچه فعالیت پروتئولیتیکی مطلوبی نشان می‌داد اما رشد مناسبی در محیط کشت نداشت و بنابراین مورد شناسایی ژنومی قرار نگرفت. جدایه با کد SRM3 نیز رشد مطلوبی نداشت ضمن اینکه از نظر فعالیت پروتئازی نیز ضعیف بود و بنابراین مورد شناسایی ژنومی قرار نگرفت.

وویلمرد و همکاران (۱۹۸٦) بیان کردند که زمانی یک نژاد باکتریایی "پروتئولیتیک" نامیده می‌شود که بتواند بر روی پلیت هاله شفاف پروتئولیز بین ۱۵ و ۲۱ میلی‌متر ایجاد کند [۱۷]. اگرچه گفته شده است چنانچه نسبت قطر هاله روشن به قطر کلنی بیش از ۱/۵ باشد، میکروارگانیسم مذکور فعالیت پروتئولیتیکی نسبتا بالا دارد [۱۸].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-10]

Table 1 Molecular identification and proteolytic activity of lactic acid bacteria isolated from different raw milk

Clear zone on Skim milk agar (mm)	Identitiy (%)	Molecular identification	source	code	Nu.
15	98	*Lactobacillus delbruekii*	cow	BRM1	1
20	98	*Streptococcus lutetiensis*	cow	BMM1	2
14	98	*L. delbruekii*	goat	ORM1	3
12	97	*L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*	goat	ORM3	4
14	99	*Lactobacillus curvatus*	goat	ORM4	5
23	99	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*	cow	BRM3	6
15	98	*L. delbruekii*	goat	ORT2	7
19	97	*L. delbruekii*	goat	ORT3	8
17	99	*L. delbruekii*	cow	BRT1	9
12	98	*Lactobacillus fermentum*	cow	BRT4	10
11	99	*Lactobacillus reuteri*	ewe	SRM2	11
20	-	-	cow	BRM2	12
8	-	-	ewe	SRM3	13

۳-۳-شناسایی ژنومی جدایه‌ها

شناسایی ژنومی جدایه‌ها بر اساس توالی قطعه مشخصی از ژن 16S rDNA و مقایسه آن با توالی‌های ژنومی ثبت شده صورت گرفت. شکل ۱ نشان دهنده ژل الکتروفورز محصولات PCR مربوط به جدایه‌های پروتئولیتیک منتخب می‌باشد که تایید کننده تکثیر مطلوب قطعه ژنی مورد نظر است. چنانچه در شکل مذکور مشخص است، محصولات PCR مربوط به تمام جدایه‌ها طولی معادل ۱۵۰۰bp داشتند. پس از تکثیر، توالی قطعات ژنی جدایه‌ها با توالی‌های ذخیره شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI، Blast گردید که نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است. با توجه به اطلاعات جدول مذکور مشاهده شد که نمونه‌های شیر مورد بررسی تنوع گونه‌ای مطلوبی از نظر حضور ۱۱ جدایه باکتری‌های اسید لاکتیک پروتئولیتیک نشان دادند که شامل شش گونه مختلف متعلق به سه جنس متفاوت می‌شد. مقایسه توالی‌ها منجر به شناسایی *Lactobacillus delbruekii*، *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*، *Streptococcus lutetiensis*، *Lactobacillus curvatus*، *Lactobacillus reuteri*، *Lactobacillus fermentum* و *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* گردید.

نظر به اعتبار و دقت شناسایی‌های صورت گرفته با استفاده از تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA، پژوهش‌های متعددی در دنیا جهت شناسایی نژادهای مختلف باکتریایی از منابع مختلف غذایی صورت گرفته است. لیت و همکاران (۲۰۱۵)، نژادهای مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده از دانه‌های کفیر در برزیل را با استفاده از این تکنیک شناسایی و ویژگی‌های پروبیوتیکی آنها را مورد بررسی قرار دادند و جدایه‌های مختلفی از *Lactococcus*، *Leuoconostoc* و *Lactobacillus* را شناسایی کردند [۱۵]. همچنین، تولینی و همکاران (۲۰۱۶)، جدایه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک بدست آمده از نمونه‌های مختلف شیر گاو و بوفالو و پنیر تهیه شده از آنها را از نظر فعالیت ضدباکتریایی و پروتئولیتیکی غربال نموده و با تکثیر قطعه ژنی 16S rDNA مورد شناسایی قرار دادند [۱]. همچنین محققان با هدف بررسی خواص پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از شیر شتر توانستند ٦ جدایه متعلق به *Lactococcus lactis* و *Lactobacillus plantarum* را به کمک توالی‌یابی قطعه ژنی 16S rRNA شناسایی کنند [٤].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-10]

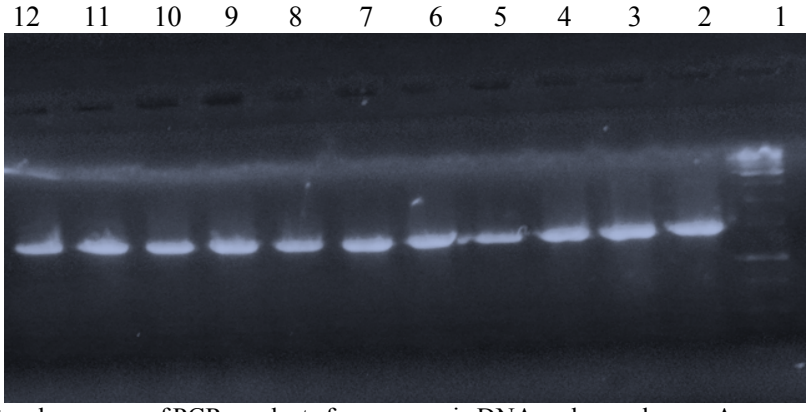

Fig 1 Electrophorogram of PCR products from genomic DNA and a marker on Agarose gel (1.5%). Lane 1: marker. Lanes 2 to 12 show PCR products.

با توجه به نتایج توالی یابی و ارزیابی فعالیت پروتئولیتیکی روی محیط Skim milk agar، مشاهده می شود که *Lc. lactis* subsp. *Lactis* (با ایجاد قطر هاله ۲۳ میلی‌متر) دارای بیشترین فعالیت پروتئولیزی بوده است و پس از آن *Lactobacillus delbrueckii* جداشده از شیر بز (قطر هاله ۱۹ میلی‌متر) و شیر گاو (قطر هاله ۱۷ میلی‌متر) بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی را داشته‌اند. در برخی مطالعات قبلی نیز فعالیت پروتئولیتیکی سویه‌های مختلف *Lc. lactis* subsp. *lactis* در مقایسه با بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک قابل توجه بوده است [۱۹، ۲۰]. لاکتوکوکوس‌ها جهت رشد نیازمند اسیدهای آمینه متعددی هستند که برای آنها ضروری یا محرک رشد به شمار می‌روند. از طرفی در شیر مقادیر محدود و اندکی اسیدهای آمینه آزاد یا اولیگوپپتید وجود دارد. به‌دلیل این محدودیت منبع نیتروژن، چنانچه این باکتری نتواند یک سیستم پروتئولیتیکی جهت شکستن کازئین شیر تامین کند، رشد آن در شیر به سرعت متوقف می‌شود و نمی‌تواند به عنوان یک آغازگر موفق مورد استفاده قرار گیرد [۲۱]. پروتئینازهای متصل به دیواره سلولی مرحله نخست تجزیه کازئین را انجام می‌دهند. در سویه‌های مختلف *Lc. lactis*، این پروتئینازها، سرین پروتئازهایی با pH بهینه حدود ٦ هستند. سیستم پروتئولیتیکی باکتری های اسید لاکتیک ها از جمله *Lc. lactis* به طور گسترده توسط پژوهشگران مورد مطالعه قرار گرفته است. بر اساس نوع فعالیت دو نوع از این پروتئینازها از یکدیگر متمایز می‌شوند. یکی، پروتئیناز نوع P1 که عمدتا بر روی بتا-کازئین عمل می‌کند. و دیگری نوع P_{III} که بر روی آلفا، بتا و کاپا-کازئین عمل می‌کند. در *Lc. lactis* subsp. *lactis* نوع P_I مشاهده می‌شود [۲۲]. گونه‌های لاکتوباسیلوس عموما پروتئولیتیک‌های ضعیفی هستند [۲۱]. اما نژادهایی از *Lactobacillus helveticus*، و *L. delbreuckii* subsp. *bulgaricus* فعالیت پروتئولیتیکی مطلوبی نشان داده و بطور موثری توانسته‌اند پروتئین شیر را هیدرولیز نموده و پپتیدهای زیست فعال آزاد نمایند [۲۰]. از بین لاکتوباسیلوس‌های شناسایی شده در مطالعه حاضر، *L. reuteri* کمترین فعالیت پروتئولیتیک را نشان داد که با مطالعات پیشین که در آن‌ها به فعالیت پروتئازی پایین آن اشاره داشته و عنوان شده که رشد کند این گونه در شیر و عدم توانایی آن در اسیدی کردن سریع شیر نیز به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی ضعیف آن می‌باشد، مطابقت دارد [۲۳].

۳-٤- فعالیت همولیتیکی جدایه‌ها

بر طبق FAO/WHO (2002) عدم فعالیت همولیتیکی، یکی از پیش‌نیازهای ایمنی برای انتخاب یک نژاد میکروبی قابل استفاده در غذا است به‌ویژه اگر بنا باشد آن را به عنوان یک نژاد پروبیوتیک معرفی کنیم [٢٤]. با توجه به نتایج حاصل از همولیز، هیچ کدام از جدایه‌های منتخب هنگام رشد در محیط Blood agar موجب هیدرولیز گلبول‌های قرمز خون نشدند و γ-همولیتیک بودند. هرچند یک جدایه به نام *L. fermentum* فعالیت آلفا همولیتیکی نشان داد و از انجام آزمایش‌های بعدی حذف شد. این نتیجه حاکی از آن است که از ۱۱ جدایه توالی‌یابی شده، یک جدایه ایمن نبوده و ۱۰ جدایه

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-10]

منتخب، غیر بیماری‌زا می‌باشند. نتایج به دست آمده از این تحقیق با یافته‌های تجرو-سارینا (۲۰۱۲) مطابقت دارد [۲۵]. همچنین اووسو-کارتنگ و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که از بین ۱۶ نژاد *L. fermentum* جدا شده از خمیر ارزن تخمیری، دو جدایه آلفا همولیز بودند [۲۶]. در حالی که محمودی و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند از میان ۱۴ *L. fermentum* به دست آمده از شیر خام شتر همگی γ- همولیتیک بودند [۲۷]. همچنین در تحقیقات ماراکوداکیسا و همکاران (۲۰۰۶)، هیچ کدام از گونه‌های *Lactobacillus* جدا شده از فرآورده‌های لبنی فعالیت β- همولیتیک نشان ندادند و همگی γ- همولیتیک بودند [۲۸].

۳-۵- بررسی حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک

حساسیت و مقاومت جدایه‌های لاکتیکی در مقابل ۱۰ آنتی‌بیوتیک مهارکننده سنتز پروتئین و مهارکننده دیواره سلولی در جدول ۲ نشان داده شده است. لازم به ذکر است *Streptococcus lutetiensis* با کد BMM1 و *L. delbruekii* با کد ORM1 به دلیل عدم رشد کافی از آزمون مقاومت به آنتی-بیوتیک حذف شدند.

Table 2 Antibiotic sensitivity of isolated lactic acid bacteria

Antibiotic / isolate	tetracyclin	penicilline	ampicilin	chloramphenicol	vancomycin	Streptomycin	gentamicin	Kanamycine	erithromycin	clindamycin
	Clear zone (mm)									
L. delbruekii (BRM1)	20 S	20 S	20 S	17 I	24 S	15 S	20 S	23 S	25 S	22 S
L. delbruekii subsp. *bulgaricus* (ORM3)	28 S	0 R	29 S	0 R	20 S	0 R	17 S	0 R	26 S	20 I
L. curvatus (ORM4)	20 S	0 R	25 S	0 R	24 S	0 R	20 S	0 R	20 I	22 S
Lac. lactis subsp. *lactis* (BRM3)	20 S	0 R	30 S	18 S	18 S	0 R	12 R	0 R	25 S	27 S
L. delbruekii (ORT2)	25 S	30 S	27 S	۲۱ S	24 S	15 S	15 S	13 R	27 S	19 I
L. delbruekii (ORT3)	28 S	18 S	34 S	۱۷ I	30 S	18 S	19 S	20 S	24 S	38 S
L. delbruekii BRT1	27 S	15 S	19 S	۲۲ S	20 S	15 S	17 S	24 S	28 S	22 S
L. reuteri SRM2	20 S	33 S	25 S	۲۰ S	0 R	0 R	18 S	0 R	26 S	24 S

S: sensitive, I: semi-sensitive, R: resistant

در میان جدایه‌ها، *L. delbruekii* (BRM1)، *L. delbruekii* (BRT1)، *L. delbruekii* (ORT3) به ۱۰ آنتی‌بیوتیک مورد آزمون حساس بودند و *L. delbruekii* (ORT2)، فقط به کانامایسین مقاومت نشان داد. چنانچه در مطالعات مختلف گزارش شده‌است می‌توان گفت بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشند. این ویژگی اغلب ذاتی و غیر قابل انتقال است. هرچند برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک مانند بعضی از نژادهای *L. fermentum*، *L. plantarum* و *L. reuteri* احتمال دارد حامل ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک قابل انتقال کد شده روی پلاسمید باشند. انتقال ژن‌های مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک به باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای، دغدغه اصلی برای سلامتی

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-10]

است. هر نژادی که دارای پلاسمیدهای مقاومت به آنتی‌بیوتیک باشد جهت استفاده به عنوان پروبیوتیک‌های انسانی و حیوانی نامناسب در نظر گرفته می‌شوند. از طرف دیگر، نژادهای پروبیوتیک دارای مقاومت ذاتی به آنتی‌بیوتیک ممکن است برای بیمارانی که با مصرف داروهای ضد میکروبی مختلف، دچار کاهش یا عدم تعادل در میکروفلور نرمال روده‌ای می‌شوند، مفید باشد [۲۹]. لیت و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش کردند که نژادهای *Lactobacillus* جداشده از دانه‌های کفیر نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها به جز ونکومایسین حساسیت نشان دادند. این درحالی است که تمام جدایه‌های مطالعه حاضر به جز *Lactobacillus reuteri* SRM2 به ونکومایسین حساسیت نشان دادند [۱۵]. در میان مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، مقاومت به ونکومایسین، از همه مهمتر است زیرا ونکومایسین یکی از آخرین آنتی‌بیوتیک‌هایی است که در مقابل عفونت‌های بالینی ایجاد شده توسط پاتوژن‌های مقاوم به چندین دارو، کارایی گسترده‌ای دارد. با این حال برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک مانند نژادهای *L. casei*، *L. rhamnosus*، *L. plantarum*، *pediococci* و *Leuconostoc* به ونکومایسین مقاوم هستند که این ژن مقاومت، روی کروموزوم کد شده و غیر قابل انتقال می‌باشد [۲۹]. بر خلاف نتایج تحقیق حاضر، اکثر گونه‌های *Lactobacillus*، حامل ژن مقاومت به ونکومایسین روی کروموزوم هستند و چنین مقاومت ذاتی به دلیل وجود دی-آلانین دی-لاکتات به‌جای دی پپتید دی-آلانین دی-آلانین در پپتیدوگلیکان آن‌ها است [۳۰]. در تحقیقات ماراکوداکیسا و همکاران (۲۰۰۶) نیز ۲۵ نژاد به ونکومایسین مقاوم و ٤ نژاد از *L. paracasei* و *L. rhamnosus* به این آنتی‌بیوتیک حساس بودند [۲۸]. همچنین در مطالعات فرانسیوسی و همکاران (۲۰۰۹) نژادهای *Lac. lactis* subsp. *lactis* و *Lac. lactis* *subsp. cremoris* به ونکومایسین حساس بودند [۱۰] که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

L. delbruekii subsp. *bulgaricus* (ORM3)، *L.* *curvatus* (ORM4)، *Lac. lactis subsp. lactis* (BRM3) و *L. reuteri* (SRM2) به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مقاومت نشان دادند. مقاومت به آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین، کانامایسین و استرپتومایسین) در لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از مواد غذایی تخمیری مختلف مانند *L. bulgaricus* و *L. paracasei* جدا شده از انواع ماست، *L. helveticus*، *L. delbrueckii* subsp. *lactis*، *L. rhamnosus*، *L. casei* و *L. fermentum* جدا شده از پنیر گزارش شده است که در تطابق با نتایج این تحقیق می‌باشد. مقاومت ذاتی به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی در گونه‌های *Lactobacillus* می‌تواند به عدم وجود سیستم انتقال الکترون وابسته به سیتوکروم و همچنین به تغییرات در نفوذپذیری غشا مرتبط باشد [۳۱].

به طور کلی، گونه‌های *Lactobacillus* به بسیاری از مهارکننده‌های سنتز دیواره سلولی مانند پنی‌سیلین‌ها حساس هستند. هرچند مقاومت گسترده‌ای در مقابل پنی‌سیلین‌ها خصوصا پنی‌سیلین G در لاکتوباسیلوس‌های مورد استفاده تحت عنوان پروبیوتیک یا کشت‌های آغازگر، در *L. rhamnosus*، *L. reuteri* و *L. plantarum* جدا شده از پنیر، در *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* جدا شده از انواع ماست چینی و در *L. curvatus* و *L. sakei* از سوسیس‌های خشک تخمیری و غیره مشاهده شده است [۳۱]. مشابه این نتایج، در پژوهش حاضر نیز دیده شد که برخی از جدایه‌ها به پنی‌سیلین مقاومت نشان دادند.

نژادهای مختلف *Lc. lactis* معمولا به آنتی‌بیوتیک‌های گرم مثبت از جمله اریترومایسین و ونکومایسین و همچنین به آنتی-بیوتیک‌های وسیع الطیف مانند کلرآمفنیکول، پنی‌سیلین و آمپی-سیلین حساس هستند [۳۲]. این در حالی است که اغلب گونه-های لاکتوکوکوس به جنتامایسین و کانامایسین مقاوم‌اند [۳۲]. چنین الگوی مقاومت یا حساسیت دقیقا در مطالعه حاضر در مورد *Lc. lactis* subsp. *lactis* نیز مشاهده گردید.

٤- نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه با بهره‌گیری از تکنیک‌های مولکولی، باکتری‌های اسید لاکتیک دارای فعالیت پروتئولیتیکی مناسب از نمونه‌های مختلف شیر خام گاو، گوسفند و بز جداسازی و شناسایی شدند. با توجه به تنوع زیستی و شدت فعالیت پروتئولیتیکی مشاهده شده، ایجاد مجموعه‌ای از آغازگرهای پروتئولیتیک که بتوانند در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-10]

مقیاس صنعتی به عنوان کشت‌های آغازگر یا همراه مورد استفاده قرار گیرند امکان‌پذیر و حائز اهمیت خواهد بود. با این وجود به دلیل اینکه برخی از ویژگی‌های تکنولوژیک باکتری‌های اسید لاکتیک وابسته به نژاد می‌باشد، جداسازی چنین باکتری‌هایی از مناطق مختلف کشور پیشنهاد می‌گردد. همچنین بر اساس نتایج این مطالعه، بررسی جنبه‌های ایمنی باکتری‌های جدا شده امری ضروری خواهد بود.

۵- سپاسگزاری

یافته‌های این مقاله از طرح پژوهشی با شناسه ۳۳-۳۵٤-۹۵ استخراج شده است. بدینوسیله، نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان جهت حمایت مالی طرح مذکور تشکر و قدردانی می‌نمایند.

٦- منابع

[1] Tulini, F.L., Hymery, N., Haertlé, T., Le Blay, G., and De Martinis, E.C.P. 2016. Screening for antimicrobial and proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from cow, buffalo and goat milk and cheeses marketed in the southeast region of Brazil. Journal of Dairy Research, 83, 115-124.

[2] Shahrampour, D., Khomeiri, M., Kashiri, M., Razavi, S. A. 2019. Evaluation of Antibacterial and Antifungal activity of Indigenous *Lactobacillus plantarum* isolated from various foods. Modares Journal of Food Science and Technology, 85 (15): 327-336. (In Persian)

[3] Zoumpopoulou, G., Tzouvanou, A., Mavrogonatou, E., Alexandraki, V., Georgalaki, M., Anastasiou, R., Papadelli, M., Manolopoulou, E., Kazou, M., & Kletsas, D., Papadimitriou, K., and Tsakalidou, E. 2017. Probiotic Features of Lactic Acid Bacteria Isolated froma Diverse Pool of Traditional Greek Dairy Products Regarding Specific Strain-Host Interactions. probiotics and antimicrobial proteins. 10 (2): 313–322.

[4] Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N.P. and Ayyash, M. 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. LWT - Food Science and Technology, 79: 316-325

[5] Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill., C. 2017. Raw donkey milk as a source of Enterococcus diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. Food Control, 73: 81-90.

[6] Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, M., Henni, D. E., Kihal, M. 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. Food Microbiology. 21 (5): 579-588.

[7] Savijoki, K., Ingmer, H., and Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 71: 394-406.

[8] Georgala, A.K., Tsakalidou, E., Kandarak, I., Kalantzopoulos, G. 1997. An Index of Proteolysis Degree in Ewes' Milk and Ewes' Milk Yoghurt, by single Strains and Combinations of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, Isolated from Traditional Greek Yoghurt. Food Science and technology international. 3 (3): 259-263.

[9] Soleymanzadeh, N., Mirdamadi, S., and Kianirad, M. 2016. Antioxidant activity of camel and bovine milk fermented by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented camel milk (Chal). Dairy Science & Technology. 96: 443-457.

[10] Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., and Poznanski, E. 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. International Dairy Journal. 19: 3–11.

[11] Delavenne, E., Mounier, J., Déniel, F., Barbier, G., and Le Blay, G. 2012. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. International Journal of Food Microbiology. 155: 185–190.

[12] Medina, R., Katz, M., Gonzalez, S, Oliver, G. 2001. Characterization of the Lactic Acid Bacteria in Ewe's Milk and Cheese from Northwest Argentina. *Journal of Food Protection, 64 (4): 559–563*

[13] Wouters, J., Ayad E., Hugenholtz, J., Smit, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. International Dairy Journal. 12 (2-3): 91-109.

[14] Forghani, F., Nazemi, A., Sharifi, S., Eskandari., M. 2010. Isolation and Molecular identification of Lactic Acid Bacteria of Raw Milks from Central Alborz. Journal of Microbial Biotechnology, 5 (2): 21-28. (In Persian)

[15] Leite, A. M. O., Miguel, M. A. L., Peixoto,

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-10]

R. S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V. M. F., Mayo, B., and Delgado, S. 2015. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. Journal of Dairy Science. 98:3622–3632.

[16] CLSI. 2013. "Disc diffusion supplemental tables'' Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Adapted in part from CLSI document M100-S23 (M02-A11); Wayne, PA 19807: Clinical and Laboratory Standards Institute.

[17] Vuillemard, J. C., Amiot, J, and Gauthier, S. 1986. Evaluation de l'activite proteolytique de bacteries lactiques par une methode de diffusion sur plaque. Microbiology-Aliments-Nutrition 3 327–332.

[18] Lawalat, H. J., Satiman, U. 2015. Identification of Lactic Acid Bacteria Proteolytic Isolated from An Indonesian Traditional Fermented Fish Sauce Bakasang by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA). International Journal of ChemTech Research, 8 (12): 630-636.

[19] Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., Dary-Mourot, A. 2014. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. Food Research International. 63, 71-80.

[20] Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I., Otte, J. 2009. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. International Dairy Journal, 19(3), 155-165.

[21] Barrangou, R., Lahtinen, S. J., Ibrahim, F., Ouwehand, A. C. Genus Lactobacillus. In: Lahtinen et al. (Editors). Lactic acid bacteria; Microbiological and functional aspects. 4nd edition. CRC press. 2012. P, 81.

[22] Tan, P. S. T., Poolman, B., Konings, W. N. 1993. Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. Journal of Dairy Research. 60: 269-286.

[23] Hidalgo-Morales, M., Robles-Olvera, V., García, H. S. 2005. Lactobacillus reuteri β-galactosidase activity and low milk acidification ability. Canadian journal of microbiology, 51(3), 261-267.

[24] FAO/WHO, 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.

[25] Tejero-Sariñena, S., Barlowb, J., Costabile, A., Gibson, G.R., and Rowland, I. 2012. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. Anaerobe. 18: 530-538.

[26] Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Akabanda, F., and Jespersen, L. 2015. Technological properties and probiotic potential of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from West African fermented millet dough. BMC Microbiology. 15: 261-270. .

[27] Mahmoudi, I., Ben Moussaa, O., Moulouk Khaldi, T. E., Kebouchib, M., Soligot, C., 341 Le Roux, Y. and Hassouna, M. 2016. Functional in vitro screening of *Lactobacillus* 342 strains isolated from Tunisian camel raw milk toward their selection as probiotic. *Small* 343 *Ruminant Research*, 137: 91-98.

[28] Maragkoudakisa, P. A., Zoumpopouloua, G., Miarisa, C., Kalantzopoulosa, G., Potb, 345 B. and Tsakalidoua, E. 2006. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from 346 dairy products. *International Dairy Journal*, 16: 189-199.

[29] Zhoua, J.S., Pillidgec, C.J., Gopalc, P.K., and Gill, H.S. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. International Journal of Food Microbiology, 98: 211 – 217.

[30] Ammor, M.S., Flórez, A. B., Van Hoek, A.H.A.M., Reyes-Gavilan, C.G.D.L., Aarts, H.J. M., Margolles, A., & Mayo, B. (2008). Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 14: 6–15.

[31] Abriouel, H., Muñoz, M.C.C., Lerma, L.L., Montoro, B.P., Bockelmann, W., Pichner, R., Kabisch, J., Cho, G.S., Franz, C.M.A.P., Gálvez, A., and Benomar, N. 2015. New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. Food Research International, 78: 465-481.

[32] Ammor, M.S., Flórez, A. B., Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiology, 24: 559-570.

bifidobacteria. Food Microbiology, 24: 559-570.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-10]

Isolation, molecular identification and safety assessment of proteolytic lactic acid bacteria obtained from different raw milks

Moayedi, A. [1*], Mahmoudi, M. [2], Khomeiri, M. [3], Loghman, Sh. [4]

1. Assistant professor, Department of food science and technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Ph.D. Graduate, Department of food science and technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. Associate professor, Department of food science and technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
4. M.Sc. Graduate, Department of food science and technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

(Received: 2019/03/17 Accepted:2019/05/25)

Some lactic acid bacteria (LAB), in particular proteolytic strains, in raw milk have useful technological properties and play important role in developing desired characteristics in the final products. However, they are mostly lost during heating and technological processes. Therefore, it would be important to be isolated and maintained for further applications as pure adjunct cultures. In this study, after selective isolation of LAB from raw cow's, ewe's and goat's milks on MRS agar and M17 agar, gram-positive catalase-negative were selected and maintained as pure cultures. Then, the isolates were screened according to their proteolytic activities on skim milk agar (well-diffusion method). The potent gram-positive, catalase-negative proteolytic strains were identified via 16S rDNA gene sequencing and antibiotic resistance (10 antibiotic agents, disc-diffusion method) and hemolytic activities (on blood agar containing 5% sheep blood) were evaluated. BLAST analysis resulted in identification of *Lactobacillus delbruekii* (five isolates), *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. curvatus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, and *Streptococcus lutetiensis*. *L. lactis* subsp. *lactis* obtained from cow milk showed the highest proteolytic activity as a 23-mm halo zone was observed on skim milk agar plate after 48 h incubation at 37 °C. In case of hemolysin production, only *Lactobacillus fermentum* showed α-hemolytic activity and the others showed no activities. All the identified isolates were sensitive to tetracycline, ampicillin, erythromycin, vancomycin and gentamycin with the exception of *L. reuteri* and *lactococcus lactis* subsp. *lactis* that found to be resistant to vancomycin and gentamycin, respectively. About penicillin, chloramphenicol, clindamycin, kanamycin and streptomycin, the results were varied. Our results verified diversity of wild proteolytic LAB strains in raw milk, as reported before. Although LAB mainly belong to the GRAS list, strains isolated from raw milk should be re-checked for their safety-related properties.

Keywords: Raw milk, Proteolysis, Lactic acid bacteria, Safety

*Corresponding Author E-Mail Address: amoayedi@ut.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-10]