Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۵، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۱۵۵- ۱۶۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۰۴ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۰۴

غربال‌گری لاکتوباسیل‌های بومی ایران از نظر تولید اسید لاکتیک و شناسایی سویه‌های برتر

فاطمه سلیمانی فرد: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، اراک، ایران، soleimanif@ymail.com
مریم قبادی دانا *: استادیار ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، تهران، ایران، dana.m@standard.ac.ir
زهرا پیراوی ونک: استادیار صنایع غذایی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، تهران، ایران، zpiravi@gmail.com

چکیده

مقدمه: لاکتوباسیل‌ها دسته‌ای از باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند که محصول نهایی تخمیر آن‌ها اسیدلاکتیک است. هدف از پژوهش حاضر، انتخاب لاکتوباسیل‌های بومی تولید کننده اسیدلاکتیک تک ایزومره است.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، سویه‌های بومی بر اساس توانایی تولید اسیدلاکتیک غربال‌گری شد. غربال‌گری در دو مرحله انجام شد. مرحله اول به روش تیتراسیون و مرحله دوم به روش آنزیماتیک بود. سویه‌های برتر حاصل از روش تیتراسیون برای انجام آزمون آنزیمی انتخاب شد. در نهایت، سویه‌های برتر که توانایی تولید اسیدلاکتیک تک ایزومره را داشتند توسط آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. سپس، شناسایی مولکولی سویه با استفاده از تعیین توالی *16S rRNA* انجام شد.

نتایج: در پژوهش حاضر، توانایی ۷۹ سویه لاکتوباسیل بومی از نظر تولید اسیدلاکتیک بررسی شد. بالاترین میزان تولید ۳۴/۸ و پایین‌ترین میزان تولید ۱۲/۴ میلی‌گرم در گرم محاسبه شد. لاکتوباسیل‌های برتر از نظر تولید اسیدلاکتیک توانایی تولید یک نوع ایزومر نوری (+) L را داشتند که بالاترین میزان (+) L اسیدلاکتیک برابر با ۳/۹۹ و پایین‌ترین میزان برابر با ۱/۰۳ میلی‌گرم در گرم بود. نتایج بیوشیمیایی و مقایسه سویه‌های برتر با اطلاعات موجود در بانک ژنومی نشان داد که آن سویه‌ها*لاکتوباسیلوس پاراکازئی* هستند. سپس، توالی *16S rRNA* چهار سویه برتر به شماره دسترسی‌های KF735654، KF735655، KJ508201 و KJ508202 در بانک ژنومی، مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی ثبت شد.

بحث و نتیجه‌گیری: میزان تولید اسید لاکتیک توسط لاکتوباسیل‌های بومی بسیار متفاوت مشاهده شد و مقدار تولید اسید برخی از سویه‌ها نسبت به گزارش‌های موجود، تولید بیش‌تری را نشان داد. لاکتوباسیل‌های برتر تنها توانایی تولید ایزومر نوری (+) L اسیدلاکتیک را داشتند. نتایج پژوهش حاضر، استفاده از سویه‌های برتر لاکتوباسیل برای تولید اسیدلاکتیک خالص را پیشنهاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: غربال‌گری، لاکتوباسیل، اسیدلاکتیک، PCR

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اسیدلاکتیک یک اسید آلی هیدروکسیل‌دار با وزن مولکولی ۹۰/۰۸ گرم بر مول و ثابت تفکیک $۱/۳۷\times۱۰^{-۴}$ در ۲۵ درجه سلسیوس است که در طبیعت به طور گسترده وجود دارد و فرمول آن (۲- هیدروکسی پروپیونیک اسید[۱] یا ۲- هیدروکسی پروپانوئیک اسید، CH3CHOHCOOH) است (۱- ۳). نخستین بار در سال ۱۷۸۰، شیل[۲] شیمیدان سوئدی از شیر ترش شده، اسیدلاکتیک را جداسازی کرد. او از نظر شیمیایی این اسید را باعث ترش شدن شیر دانست و پی برد که این اسید یکی از اجزای شیر است (۱، ۳ و ۴). پاستور در سال ۱۸۵۷ کشف کرد که اسیدلاکتیک جزو ترکیب شیر نیست بلکه یکی از متابولیت‌های تخمیری تولید شده توسط برخی از میکروارگانیسم‌هاست (۴). اسیدلاکتیک دارای فعالیت نوری است و به دو شکل ایزومری (+) L و (-) D وجود دارد. اسیدلاکتیک (+) L قابل تجزیه است و می‌تواند در بدن انسان متابولیزه شود و این خاصیت به کاربرد اسیدلاکتیک در زمینه‌های زیست مواد و زیست پزشکی منجر شده است (۱، ۳ و ۵). از آنجا که بدن انسان فاقد آنزیم D لاکتات دهیدروژناز است مصرف زیاد اسیدلاکتیک (+) L موجب تجمع آن در بدن شده و برای سلامتی انسان مضر است (۴- ۶). تولید اسیدلاکتیک به دو شکل سنتز شیمیایی و تخمیر میکروبی انجام می‌شود. با روش سنتز شیمیایی فقط مخلوط راسمیک DL اسیدلاکتیک تولید می‌شود (۷ و ۸). ۹۰ درصد تولید اسیدلاکتیک در سرتاسر جهان توسط تخمیر میکروبی انجام می‌شود (۸ و ۹). از آنجا که برخی از باکتری‌ها قادر به تولید اسیدلاکتیک به شکل تک ایزومره هستند می‌توان با استفاده از آن‌ها، اسیدلاکتیک (+) L یا (-) D خالص تولید کرد (۷ و ۸).

لاکتوباسیلوس‌ها[۳] یکی از باکتری‌های مهم تولید کننده اسید لاکتیک هستند. در صنعت از لاکتوباسیل‌ها برای مصارف گوناگون استفاده می‌شود. این باکتری‌ها در محصولات و فرآورده‌های غذایی به علت تولید اسیدلاکتیک نقش نگهدارنده را دارند. همچنین، به علت ایجاد طعم‌های مختلف، ترکیبات مغذی و بافت مناسب به عنوان استارتر برای انواع مختلفی از پنیر، تخمیر غذاهای گیاهی، تخمیر گوشت، در تولید شراب، آب جو و نان نقش دارند (۱۰). جنس لاکتوباسیلوس گروه بزرگی از خانواده لاکتوباسیلاسه[۴] و به سلسله فرمی‌کوت‌ها[۵] متعلق است. این باکتری‌ها دارای بیش از ۱۰۰ گونه و زیرگونه هستند (۱۰ و ۱۱). کلونی‌های لاکتوباسیلوس روی کشت آگار معمولاً کوچک به اندازه ۲ تا ۵ میلی‌متر با حاشیه کامل، محدب، صاف، درخشان یا کدر و بدون پیگمان است. در موارد نادر پیگمانشان مایل به زرد و یا قرمز شده و برخی گونه‌ها نیز فرم کلونی‌هایشان خشن است (۱۲). شکل میکروسکوپی این باکتری‌ها به شکل میله‌ای شکل به اشکال متنوع باسیل‌های باریک و بلند تا کوکوباسیل کوتاه است. سلول‌ها بیشتر آرایش زنجیره‌ای داشته و به شکل گرم مثبت، بدون اسپور و بندرت متحرک هستند (۱ و ۱۲). این باکتری‌ها بی هوازی اختیاری یا میکروآئروفیل[۶] هستند. وجود ۵ درصد دی‌اکسیدکربن در محیط باعث تحریک رشد آن‌ها می‌شود (۱۲ و ۱۳). دمای بهینه رشد آن‌ها بین ۳۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس است. اسیدیته بهینه برای رشد آن‌ها در حدود ۵/۵ تا ۵/۸ است اما آن‌ها در اسیدیته کمتر از ۵ نیز قادر به رشد هستند (۱ و ۱۲). این باکتری‌ها از نظر نحوه تخمیر کربوهیدرات‌ها، به دو گروه تقسیم می‌شوند: ۱- هموفرمانتاتیو[۷] (جور تخمیر) که قند را فقط به اسیدلاکتیک تبدیل می‌کنند.

www.SID.ir

Archive of SID

۲- هتروفرمانتاتیو[۸] (ناجور تخمیر) که قند را به اسیدلاکتیک، اسیداستیک، اتانول و دی اکسیدکربن تبدیل می‌کنند (۱، ۱۰ و ۱۲). برای تولید اسیدلاکتیک خالص به روش میکروبی نیاز به سویه‌های تولید کننده اسیدلاکتیک از نوع هموفرمانتاتیو است. در پژوهش حاضر، توانایی ۷۹ سویه بومی لاکتوباسیل از نظر تولید اسیدلاکتیک بررسی و سویه‌های برتر تولید کننده ایزومر خالص اسیدلاکتیک (+) L شناسایی شد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، از سویه‌های جداسازی شده توسط دکتر مریم قبادی دانا از فرآورده‌های لبنی سنتی استفاده شد که در گروه پژوهشی میکروبیولوژی پژوهشگاه استاندارد نگهداری می‌شوند. سویه‌ها در محیط ام آر اس آگار[۹] به شکل کشت خطی کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شیشه بی‌هوازی و در شرایط میکروآئروفیل گرمخانه‌گذاری شد. سپس، ویژگی‌های ریخت‌شناسی سویه با رنگ‌آمیزی گرم مشخص شد. برای بررسی تولید اسید سویه‌ها، از محیط کشت اسکیم میلک استفاده شد. این سویه‌ها از نظر تولید اسیدلاکتیک در دو مرحله غربال‌گری شدند. در مرحله اول، غربال‌گری به روش تیتراسیون انجام شد و در مرحله دوم، سویه‌های برتر به روش آنزیماتیک غربال‌گری شدند. سپس، سویه‌های برتر تولید کننده ایزومر (+) L اسیدلاکتیک با استفاده از تخمیر قندها شناسایی بیوشیمیایی شدند و در نهایت، شناسایی دقیق گونه این لاکتوباسیل‌ها با استفاده از تعیین توالی *16S rRNA* آن‌ها انجام شد.

روش تیتراسیون: ابتدا از کلونی خالص در محیط اسکیم میلک پاساژ داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از پایان گرمخانه‌گذاری و بسته شدن محیط، یک گرم از محیط بسته شده به دقت وزن شده و به آن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲۰ میلی‌لیتر سود ۰/۱ نرمال اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه، حدود ۰/۵ میلی‌لیتر محلول فنل فتالئین ۱درصد به عنوان اندیکاتور اضافه شد. سپس، نمونه‌ها با هیدروکلریک اسید[۱۰] ۰/۱ نرمال تیتر شدند. مقدار اسیدلاکتیک تولید شده توسط هر سویه بر حسب میلی‌گرم در گرم طبق فرمول محاسبه شد (هر میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم مصرفی در تیتراسیون که به ایجاد رنگ صورتی منجر می‌شود برابر است با ۹۰/۱ میلی‌گرم اسیدلاکتیک) (۱۴). برای اعتبار بخشی این آزمون از اسیدلاکتیک خالص تهیه شده از شرکت مرک[۱۱] با درجه خلوص ۹۰ درص، به عنوان کنترل مثبت تیتراسیون استفاده شد. سپس، از سویه‌های لاکتوباسیلی که میزان تولید اسیدلاکتیک آن‌ها در رده تولید زیاد قرار داشتند سه تکرار انجام و تکرار پذیری تولید اسید توسط سویه‌ها بررسی شد.

روش آنزیمی: در این روش، آنزیم اختصاصی (L- لاکتات دهیدروژناز و D- لاکتات دهیدروژناز)، لاکتات حاصل را به پیرووات و NADH[۱۲] تبدیل کرده و میزان تولید NADH در حضور هر آنزیم، معرف میزان نوع ایزومر نوری مربوط به آن آنزیم است (۱۵). سویه‌هایی که در مرحله اول میزان اسیدلاکتیک بیشتری تولید می‌کردند و تولید آن‌ها تکرارپذیر بود، برای غربال‌گری به روش آنزیماتیک انتخاب و نوع ایزومر اسیدلاکتیک تولیدی آن‌ها تعیین شد. در این روش، پس از کشت سویه‌ها در محیط کشت اسکیم میلک و گرمخانه‌گذاری مطابق با روش ISO 9232 پروتئین‌زدایی شد (۱۵). میزان (+) L و (-) D

www.SID.ir

Archive of SID

اسیدلاکتیک مایع پروتئین‌زدایی شده توسط آنزیم D- لاکتات دهیدروژناز و L- لاکتات دهیدروژناز به‌طور جداگانه با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۴۰ نانومتر تعیین شد (۱۵). برای اعتبار بخشی این آزمون نیز از اسیدلاکتیک خالص با درجه خلوص ۹۰ درصد استفاده شد. به این شکل که ۰/۱ میلی‌لیتر اسید با ۱۹/۹ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد. با آماده شدن این نمونه به همراه نمونه شاهد جذب آن‌ها، قبل و پس از اضافه شدن آنزیم L و D لاکتات دهیدروژناز در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده و میزان غلظت (+) L و (-) D اسیدلاکتیک مطابق با فرمول‌های ارایه شده در ISO 9232 محاسبه شد (۱۵).

شناسایی بیوشیمیایی سویه‌های برتر: آزمون‌های تأییدی بیوشیمیایی از قبیل ذوب ژلاتین، تولید اندول از تریپتوفان، آزمایش کاتالاز و تخمیر قندها از جمله آرابینوز، سوربیتول، سلوبیوز، ملیبیوز، مانوز، مالتوز، سالیسین، رامنوز، اینوزیتول، گزیلوز، مانیتول، ریبوز، لاکتوز، گالاکتوز، فروکتوز، سوکروز، تره هالوز و گلوکز برای سویه‌های برتر انجام شد (۱۲).

شناسایی مولکولی سویه‌های برتر: برای شناسایی مولکولی سویه‌های برتر ابتدا DNA آن‌ها استخراج شد (۱۶). سپس، با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای ابتدا و انتهای *16S rRNA*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد (۱۷). توالی آغازگرهای مورد استفاده عبارت بودند از:

F:5' GAGTTTGATCCTGGCTCA 3' و

R:5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3' واکنش PCR برای تکثیر *16S rRNA* با برنامه حرارتی زیر انجام شد: دمای دناتوره شدن اولیه ۹۵ درجه سلسیوس و مدت زمان آن ۵ دقیقه بود. سپس، ۳۰ چرخه شامل مرحله واسرشت[13] به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، مرحله اتصال[14] به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۵۷/۶ درجه سلسیوس و مرحله سنتز یا گسترش[15] به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس، سپس، مرحله گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد (۱۸). محصول PCR تعیین ترادف شده و ترادف تعیین شده با اطلاعات موجود در بانک ژنومی، مرکز اطلاعات بیوتکنولوژی[16] مقایسه شد.

برای طراحی درخت فیلوژنتیکی *16S rRNA* با استفاده از بانک ژنومی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی، توالی *16S rRNA* مربوط به چندین باکتری لاکتوباسیل که به طور کامل تعیین توالی شده‌اند شناسایی و درخت فیلوژنتیکی توسط برنامه MEGA4 و روش UPGMA با bootstrapt 10000 رسم شد.

نتایج

از میان ۷۹ سویه لاکتوباسیل که به روش تیتراسیون غربال‌گری شدند، ۱۸ سویه از نظر تولید اسیدلاکتیک در دسته تولید زیاد قرار گرفتند. ۸ سویه از نظر میزان تولید اسیدلاکتیک، تولید زیاد و از نظر تکرارپذیری، تولید آن‌ها تکرار پذیر بودند که با روش آنزیماتیک میزان تولید (+) L و (-) D اسیدلاکتیک تولیدی آن‌ها بررسی شد. ۴ سویه که زیادترین مقدار (+) L خالص به شکل تکرارپذیر تولید کردند، شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی شدند که هر ۴ سویه، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*[17] شناسایی شدند.

میزان اسیدلاکتیک تولید شده توسط ۷۹ سویه لاکتوباسیل با روش تیتراسیون بر حسب میلی‌گرم در گرم محاسبه شد. سپس، سویه‌ها بر حسب میزان تولید به ۳ دسته کم، متوسط و زیاد در جدول ۱ رده بندی شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

به این ترتیب که ۲۳ درصد سویه‌هایی که بیش‌ترین تولید را داشتند در رده تولید زیاد قرار گرفتند. ۶۲ درصد که بیش‌ترین تعداد بودند در رده متوسط قرار گرفتند. ۱۵ درصد سویه‌ها که کم‌ترین تولید را داشتند در رده تولید کم قرار گرفتند. میانگین کل مقدار تولید اسیدلاکتیک، ۲۲/۶۲ میلی‌گرم در گرم، بالاترین میزان تولید مربوط به سویه L_{175} و L_{89} با مقدار ۳۴/۸ و پایین‌ترین میزان، ۱۲/۴ میلی‌گرم در گرم بود.

در جدول ۲ نتایج میزان تولید اسیدلاکتیک سویه‌های رده تولید زیاد اسیدلاکتیک بر حسب میلی‌گرم در گرم نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود برخی از سویه‌ها از نظر تولید اسیدلاکتیک، تکرار پذیر بودند. از این سویه‌ها برای انجام مرحله بعد که سنجش میزان (+) L و (-) D اسیدلاکتیک به روش آنزیمی بود، استفاده شد.

نتایج میزان (+) L و (-) D اسیدلاکتیک به روش آنزیمی در جدول ۳ نشان داده شده است. با توجه به این که تعیین میزان تولید (-) D اسیدلاکتیک سویه‌ها با استفاده از میزان جذب آن‌ها، قبل و پس از اضافه شدن آنزیم D لاکتات دهیدروژناز در طول موج ۳۴۰ نانومتر و قرار دادن میزان جذب در فرمول مربوطه محاسبه می‌شد، (-) D اسیدلاکتیک سویه‌ها منفی گزارش شد. همچنین، (+) L اسیدلاکتیک سویه‌ها مثبت گزارش شده است (۱۵). بر اساس این نتایج سویه L_{175} بیش‌ترین (+) L اسیدلاکتیک با میزان ۳/۹۹ میلی‌گرم در گرم را در مقایسه با بقیه سویه‌ها داشته است. اسیدلاکتیک خالص با درجه خلوص ۹۰ درصد دارای هر دو ایزومر L و D است.

جدول ۱- نتایج رده بندی سویه بر اساس میزان تولید اسیدلاکتیک

رده بندی سویه‌ها	تولید اسیدلاکتیک بر حسب میلی‌گرم در گرم	تعداد فراوانی
تولید کم	۱۶-۱۲	۱۲
تولید متوسط	۲۰-۱۶	۴۹
تولید زیاد	۳۵-۲۰	۱۸

جدول ۲- نتایج حاصل از روش تیتراسیون در سویه‌های با تولید زیاد

ردیف	کد نمونه	میزان تولید اسیدلاکتیک بر حسب میلی‌گرم در گرم
۱	L_{175}	۳۴/۸±۰/۴۲
۲	L_{132}	۲۷/۳۰±۰
۳	L_{67}	۲۶/۷±۰/۴۱
۴	L_{25}	۲۶/۷±۱/۰۵
۵	L_{83}	۲۴/۳±۰
۶	L_{26}	۲۴±۱/۱۶
۷	L_{138}	۲۴±۱/۳۱
۸	L_{56}	۲۳/۷±۰/۸۴
۹	L_{147}	۲۳/۴±۱/۸۰
۱۰	L_{108}	۲۲/۵±۰/۴۲
۱۱	L_{92}	۲۲/۵±۱/۴۶
۱۲	L_{200}	۲۱/۹±۰/۸۴
۱۳	L_{104}	۲۱/۶±۰/۷۳
۱۴	L_{84}	۲۱/۳±۲/۲۴
۱۵	L_{17}	۲۰/۸±۱/۵۴
۱۶	L_{70}	۲۰/۱±۱/۶۲
۱۷	L_{124}	۲۰±۱/۲۲
۱۸	L_{105}	۲۰±۱/۹۰
۱۹	کنترل مثبت	۱۳۵±۰

محاسبه غلظت (-) D اسیدلاکتیک:

$$C_{D\,(-)} = \frac{20/45}{m \times \varepsilon} \times A_{D\,(-)}\ ;$$

$$C_{sb} = \frac{20/45}{m \times \varepsilon} \times A_{sb}$$

$$C_{D\,(-)} = C_s - C_{sb}$$

www.SID.ir

Archive of SID

$C_{D\ (-)}$: غلظت (-) D اسیدلاکتیک، بر حسب گرم در ۱۰۰ گرم نمونه کشت

$A_{D\ (-)}$: اختلاف جذب نمونه میکروبی و نمونه شاهد

C_{sb}: غلظت نمونه شاهد

A_{sb}: اختلاف جذب نمونه شاهد و شاهد

C_s: غلظت نمونه کشت میکروبی

m: مقدار گرم برداشته از نمونه کشت و نمونه شاهد

ε: ۶/۳ در طول موج ۳۴۰ نانومتر (لیتر بر میلی‌مول بر سانتی متر)

سویه‌هایی که ایزومر (+) L اسیدلاکتیک تولید کردند همه میله‌ای گرم مثبت، بدون اسپور، بدون حرکت، کاتالاز منفی و اندول منفی بوده و قادر به ذوب ژلاتین نبودند. شناسایی سویه‌ها بر اساس تخمیر هجده کربوهیدرات انجام شد که نتایج آن و نتایج رشد در دمای ۱۵ و ۴۲ درجه سلسیوس در جدول ۴ ارایه شده است.

شناسایی دقیق‌تر سویه‌های برتر تولید کننده ایزومر L (+) اسیدلاکتیک به روش مولکولی با تکثیر ژن *16S rRNA* سویه‌های برتر با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام شد. ژن *16S rRNA* سویه‌های برتر با شماره‌های KF735654، KF735655، KJ508201 و KJ508202 در بانک ژنومی، مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی ثبت شد. هر ۴ سویه برتر *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* شناسایی شدند.

ترسیم درخت فیلوژنتیکی: بر اساس *16S rRNA*، ارتباط فیلوژنتیکی سویه‌های برتر با شماره‌های KJ508201 (L25)، KJ508202 (L132)، KF735654 (L175) و KF735655 (L67) با هم و با دیگر سویه‌های لاکتوباسیل موجود در بانک ژنومی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی، بررسی و تعیین شد. فهرست سویه‌های لاکتوباسیل موجود در درخت فیلوژنی به ترتیب شکل ۱ آمده است.

جدول ۳- نتایج حاصل از روش آنزیمی در سویه‌های با تولید زیاد و تکرارپذیر

ردیف	کد نمونه	میزان (+) L اسیدلاکتیک تولید شده بر حسب میلی‌گرم در گرم	میزان (-) D اسیدلاکتیک تولید شده بر حسب میلی‌گرم در گرم
۱	L_{175}	۳/۹۹	-۱/۳۵۷
۲	L_{132}	۱/۰۶۲	-۳/۷۰۷
۳	L_{67}	۱/۰۳۵	-۴/۲۷۴
۴	L_{25}	۱/۰۳	-۵/۱۶۸
۵	L_{83}	۰/۱۲۷	-۶/۰۶۲
۶	L_{26}	۰/۰۲۹	-۴/۰۴۴
۷	L_{138}	۰/۰۲۴	-۶/۱۶۹
۸	L_{56}	۰/۰۲۰	-۶/۰۴۶
۹	کنترل مثبت	۲۰/۵۵	۲۳/۱۲

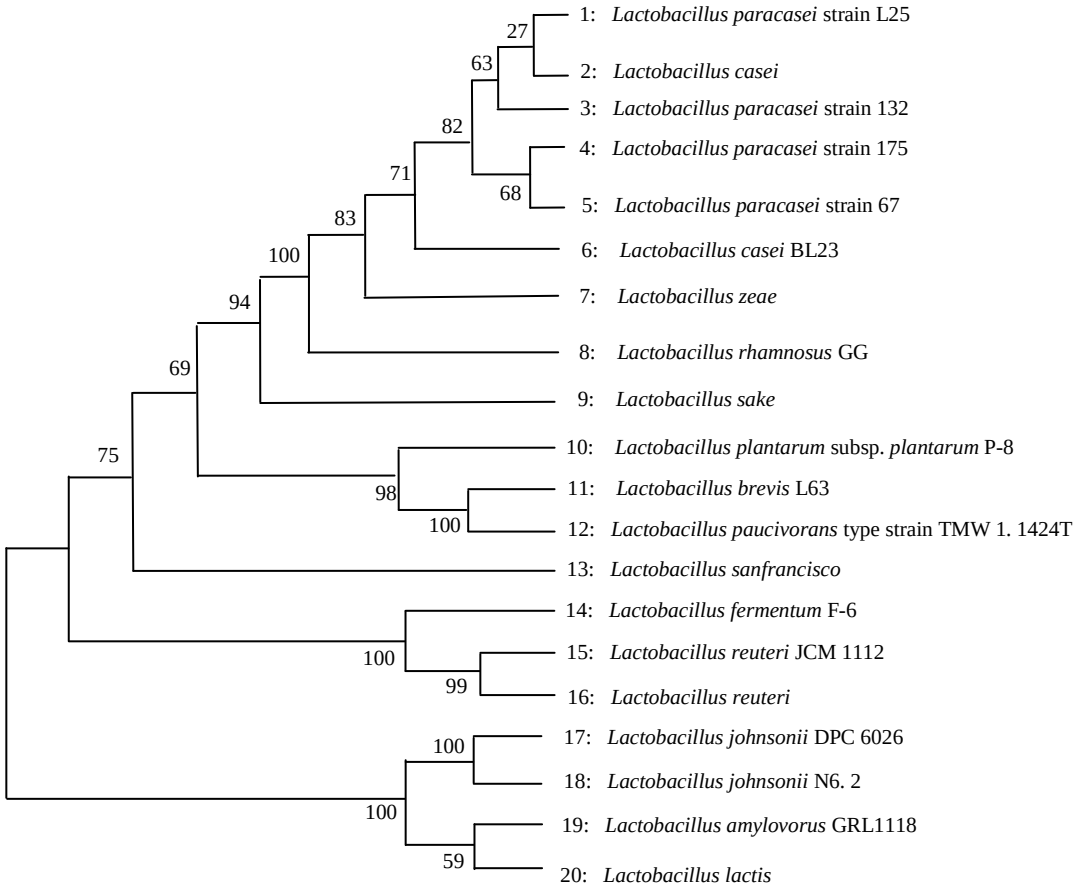
جدول ۴ - نتایج تخمیر کربوهیدرات‌ها ی سویه‌های برتر

کد نمونه	Xylose	Trehalose	Sucrose	Sorbitol	Salicin	Ribose	Rhamnose	Inositol	Melibiose	Mannose	Mannitol	Maltose	Lactose	Glucose	Galactose	Fructose	Cellobiose	Arabinose	Growth at 15°C	Growth at 42°C
L_{175}	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+
L_{132}	−	+	−	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+
L_{67}	−	+	−	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+
L_{25}	−	+	−	+	+	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+	−	+	−	−	+

www.SID.ir

Archive of SID

1) >gi|635200826|gb|KJ508201. 1| *Lactobacillus paracasei* strain L25
2) >gi|1843427|dbj|D86517. 1| *Lactobacillus casei*
3) >gi|635200827|gb|KJ508202. 1| *Lactobacillus paracasei* strain 132
4) >gi|574960707|gb|KF735654. 1| *Lactobacillus paracasei* strain 175
5) >gi|574960708|gb|KF735655. 1| *Lactobacillus paracasei* strain 67
6) >gi|191636824:c1991488-1989908 *Lactobacillus casei* BL23
7) >gi|1843426|dbj|D86516. 1| *Lactobacillus zeae*
8) >gi|385826720:c2565329-2563756 *Lactobacillus rhamnosus* GG
9) >gi|175005|gb|M58829. 1|LBARR16SAA *Lactobacillus sake*
10) >gi|501145339:c1879865-1878295 *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* P-8
11) >gi|22027048|dbj|E10216. 1| *Lactobacillus brevis* L63
12) >gi|283483492|emb|FN185731. 1| *Lactobacillus paucivorans* type strain TMW 1. 1424T
13) >gi|175006|gb|M58830. 1|LBARR16SAB *Lactobacillus sanfrancisco*
14) >gi|501673812:627796-629363 *Lactobacillus fermentum* F-6
15) >gi|184152655:c1414412-1412879 *Lactobacillus reuteri* JCM 1112
16) >gi|388037|gb|L23507. 1|LBARGDAAAA *Lactobacillus reuteri*
17) >gi|385824947:c1872967-1871317 *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026
18) >gi|560151351:c1580334-1578755 *Lactobacillus johnsonii* N6. 2
19) >gi|385816611:c1594383-1592809 *Lactobacillus amylovorus* GRL1118
20) >gi|175029|gb|M58823. 1|LBARR16SU *Lactobacillus lactis*



شکل ۱- تصویر درخت فیلوژنتیکی بر مبنای *16S rRNA* بین سویه‌های برتر با شماره‌های KJ508201 (L25)، KJ508202 (L132)، KF735654 (L175) و KF735655 (L67) با دیگر سویه‌های لاکتوباسیل موجود در پایگاه اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

اسیدلاکتیک در صنایع غذایی، شیمیایی، نساجی و پزشکی کاربردهای زیادی دارد. برای نمونه، در صنایع غذایی از اسیدلاکتیک به عنوان عوامل اسیدی کننده، طعم دهنده و نگهدارنده استفاده می‌شود (۴ و ۱۹). از اسیدلاکتیک در صنایع پزشکی برای تهیه پلاستیک‌های زیست تجزیه‌پذیر از جمله پلی لاکتیک اسیدها[۱۸] و کوپلیمرهای‌پلی لاکتیک‌اسید استفاده می‌شود که در موارد بالینی و ساخت ابزارآلات پزشکی نظیر نخ بخیه کاربرد دارند. ایزومرهای خالص (+) L و (-) D اسیدلاکتیک ارزش بیشتری نسبت به فرم راسمیک DL داشته زیرا هر ایزومر کاربرد صنعتی ویژه خود را دارند (۷). در فرآیند تولید اسیدلاکتیک، گزارش‌های متعددی درباره باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک از جمله لاکتوباسیل‌ها وجود دارد. در صنایع تخمیری از سویه‌های میکروبی هموفرمانتاتیو (جور تخمیر) برای تولید اسیدلاکتیک استفاده شده که با ساز و کار بالایی توانایی تولید (+) L اسید لاکتیک خالص را دارند(۳). بنابراین، انتخاب و شناسایی سویه‌هایی که ایزومر (+) L اسیدلاکتیک را به شکل خالص تولید می‌کنند از نظر اقتصادی مهم است.

برای انتخاب سویه‌های برتر باید از روش‌های اندازه‌گیری میزان اسیدلاکتیک تولید شده توسط سویه‌ها استفاده شود. روش‌های زیادی برای این منظور وجود دارد که می‌توان به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[۱۹]، کروماتوگرافی گازی[۲۰]، کلریمتری[۲۱]، کیت آنزیمی و تیتراسیون اشاره کرد (۲۰). ایشولا و تیو[۲۲] در سال ۲۰۱۲ میزان اسیدلاکتیک تولید شده توسط سویه‌های لاکتوباسیل را با روش تیتراسیون بررسی کردند (۲۱). ترونتل[۲۳] و همکارانش در سال ۲۰۱۱ میزان ایزومرهای L و D اسیدلاکتیک را به روش آنزیمی بررسی کردند (۲۲). پانسار[۲۴] و همکارانش در سال ۲۰۱۰ میزان اسیدلاکتیک تولید شده را به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بررسی کردند (۲۳). در این پژوهش، به علت زیاد بودن تعداد سویه‌های مورد غربال‌گری و هزینه زیاد روش‌های کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کروماتوگرافی گازی از روش کم هزینه تیتراسیون و برای افزایش دقت از روش آنزیمی به عنوان مکمل روش تیتراسیون استفاده شد.

در پژوهش حاضر، توانایی لاکتوباسیل‌ها در تولید اسید لاکتیک بسیار متفاوت مشاهده شد. به این شکل که میانگین کل تیتراسیون سویه‌ها، ۲۲/۶۲ میلی‌گرم در گرم محاسبه شد و پایین‌ترین میزان تولید در حدود ۱۲/۴ و بالاترین میزان ۳۴/۸ میلی‌گرم در گرم بود. پانسار و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در کشور ایرلند میزان اسیدلاکتیک تولید شده در سویه *لاکتوباسیلوس کازئی*[۲۵] را به میزان ۳۳/۴۸ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند (۲۳). ودنر[۲۶] و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در کشور رومانی میزان اسیدلاکتیک تولید شده در سویه *لاکتوباسیلوس پاراکازئی ۱۶۸*[۲۷] را به میزان ۴۵/۹۷ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند (۲۴). میردامادی[۲۸] و همکارانش میزان اسیدلاکتیک سویه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[۲۹] را به ترتیب ۵۹/۸۷ و ۵۸/۹۶ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند (۲۵). ایشولا و تیو در سال ۲۰۱۲ در کشور نیجریه میزان اسیدلاکتیک سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[۳۰] *LPF2* به میزان ۱/۹۶ میلی‌گرم بر گرم و سویه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*[۳۱] *LFN7* به میزان ۱/۹۱ میلی‌گرم بر گرم را گزارش کردند (۲۱). میزان تولید اسیدلاکتیک در سویه‌های مورد بررسی نسبت به مقدار اسیدلاکتیک

www.SID.ir

Archive of SID

تولید شده سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* در مطالعه پانسار و همکارانش بیشتر است اما نسبت به مقدار اسیدلاکتیک تولید شده سویه *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*، در مطالعه ودنر و همکارانش کمتر است. در این پژوهش، در مرحله دوم غربال‌گری نتایج حاصل از روش آنزیمی نشان داد که هیچ کدام از سویه‌ها ی برتر توانایی تولید ایزومر (-) D اسیدلاکتیک را نداشتند. اما ۴ سویه برتر ایزومر (+) L اسیدلاکتیک را تولید کردند. پس از بررسی با روش آنزیمی، پایین‌ترین میزان (+) L اسیدلاکتیک مربوط به سویه L_{25} با میزان ۱/۰۳ میلی‌گرم در گرم و بالاترین مربوط به سویه L_{175} با میزان ۳/۹۹ میلی‌گرم در گرم بود. ترونتل و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در کشور کرواتی میزان ایزومرهای L و D اسیدلاکتیک *لاکتوباسیلوس آمیلوورووس*[۳۲] (*DSM 20531*) را به ترتیب به میزان ۰/۰۰۸±۰/۵۶۳و ۰/۰۱۷±۰/۴۳۷ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند (۲۲). پانسار و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در کشور ایرلند تولید (+) L اسیدلاکتیک توسط *لاکتوباسیلوس کازئی* را ۳۳/۷۳ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند (۲۳). مون[۳۳] و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در کشور کره، (+) L اسیدلاکتیک *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* زیرگونه *پاراکازئی* را به میزان ۹۱/۶ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند (۲۶). میردامادی و همکارانش در سال ۱۳۸۶، میزان (+) L اسیدلاکتیک دو سویه، *لاکتوباسیلوس کازئی PTCC1608* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس PTCC1637* به ترتیب ۹۵ و ۸۱/۴۰ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند (۲۵). سرمست قفهرخی[۳۴] و همکارانش در سال ۱۳۹۱، (+) L اسیدلاکتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را ۶/۸ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند (۲۷). میزان تولید (+) L اسیدلاکتیک در سویه‌های لاکتوباسیل مورد بررسی نسبت به مقدار (+) L اسیدلاکتیک تولید شده توسط سویه *لاکتوباسیلوس آمیلوورووس*، ترونتل و همکارانش بیشتر است اما نسبت به مقدار (+) L اسیدلاکتیک تولید شده توسط سویه *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* زیرگونه *پاراکازئی*، در مطالعه مون و همکارانش و سویه *لاکتوباسیلوس کازئی*، در مطالعه پانسار و همکارانش کمتر است.

در پژوهش حاضر، نتایج تخمیر کربوهیدرات‌ها در سویه‌های برتر نشان داد که سویه‌های لاکتوباسیل، هموفرمانتاتیو هستند. با مقایسه نتایج شناسایی بیوشیمیایی این سویه‌ها با جدول تخمیر قندها در کتاب برجی، نشان داده شد که نتایج تخمیر قندها اندکی متفاوت با نتایج گزارش شده در کتاب برجی است. برای مثال، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* توانایی تخمیر قندهای سلوبیوز، مانیتول، سوربیتول و ریبوز را نداشت در حالی که ۴ سویه برتر قادر به تخمیر این قندها هستند و این سویه‌ها شبیه به لاکتوباسیل‌های دیگر در کتاب برجی[۳۵] بودند. همچنین، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* بر اساس تولید گاز از گلوکز جزو هتروفرمانتاتیوهای اختیاری است. در حالی که این ۴ سویه لاکتوباسیل طی شرایط آزمایش، ویژگی هموفرمانتاتیو را بروز دادند که با اختیاری بودن هتروفرمانتاتیو *پاراکازئی* قابل توجیه است. تانوک[۳۶] در سال ۱۹۹۹ بیان کرد که شناسایی لاکتوباسیل‌های جدا شده توسط روش‌های فنوتیپی مشکل بوده و تعیین خواص این باکتری‌ها فراتر از آزمون‌های تخمیری است (۲۸). بنابراین، می‌توان این گونه نتیجه گرفت که روش‌های بیوشیمیایی دارای معایبی است. از آن جمله این معایب می‌توان به وقت‌گیر بودن آزمون‌های بیوشیمیایی، عدم تمیز کامل بین سوش‌های مختلف یک گونه، قابلیت تکرارپذیری پایین و قدرت فرق گذاشتن

www.SID.ir

Archive of SID

کم بین سویه‌ها اشاره کرد. در منابع توصیه شده که از روش‌های ژنتیکی همراه با آزمون‌های فنوتیپی برای تایید تشخیص سویه‌های جدا شده استفاده شود (۱۳). به تازگی ژن‌های *r RNA* به عنوان روشی قوی برای تشخیص و تحلیل فیلوژنی لاکتوباسیلوس‌ها پذیرفته شده‌اند که در این روش با استفاده از پرایمرهای طراحی شده ژن‌های *16S rDNA* یا *23S rDNA* برای تعیین و تشخیص گونه‌های لاکتوباسیلوس‌ها از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده می‌شود (۲۹). بنابراین، شناسایی مولکولی و شباهت توالی *16S rRNA* باکتری‌ها نقش تعیین کننده‌ای دارد. پس از تعیین توالی *16S rRNA* و مقایسه توالی آن با توالی *16S rRNA* دیگر لاکتوباسیل‌های گزارش شده در بانک ژنی، نشان داده شد که این سویه‌ها از نظر مولکولی *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* شناسایی شدند. همچنین، بر اساس درخت فیلوژنتیکی ۴ سویه برتر با شماره‌های KF735654، KF735655، KJ508201 و KJ508202 با هم شباهت زیادی داشتند و *16S rRNA* سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* (gi 1843427) موجود در بانک ژنومی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی شباهت زیادی به *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (KJ508201) داشت. با توجه به این‌که سویه L_{175} از لرستان، سویه L_{67} از کردستان، سویه L_{132} از ایلام و سویه L_{25} از کرمانشاه نمونه‌برداری شده بودند، از نظر تولید اسیدلاکتیک نسبت به بقیه سویه‌ها برتری داشتند و فنوتیپ یکسانی را از این نظر نشان می‌دادند که همگی *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* بودند. در پایان پیشنهاد می‌شود سویه‌های تولید کننده اسیدلاکتیک به شکل تک ایزومره (+) L پس از بهینه‌سازی تولید به صنایع معرفی شوند.

تشکر و قدردانی

از کارکنان پژوهشکده صنایع غذایی کشاورزی پژوهشگاه استاندارد که در پژوهش حاضر نگارندگان را یاری دادند، تشکر وقدردانی می‌شود.

References

(1) Gunduz M. Latic acid production by *Lactobacillus casei NRRL B-441* immobilized in chitosan stabilized Ca-Alginate beads. Izmir, Turkey: Institute of Technology; 2005.

(2) John RP., Anisha GS., Nampoothiri KM., Pandey A. Direct Lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnology Advances* 2008; 27: 145- 52.

(3) Rashid R. *Optimization and Modeling of lactic acid production from pineapple waste*. Malaysia: University Technology; 2008.

(4) Wee YJ., Kim JN., Ryu HW. Biotechnological production of lactic acid and its recent application. *Food Technology Biotechnology* 2006; 44 (2): 163- 72.

(5) Reddy G., Altaf MD., Naveena BJ., Venkateshwar M., Kumar EV. Amylolytic bacteria lactic acid fermentation-A review. *Biotechnology Adv*ances 2007; 26: 22- 34.

(6) Buyukkileci AO. L (+) Lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. Turkey: Izmir Institute of Technology; 2000.

(7) Abdel-Rahman MA., Tashiro Y., Sonomoto K. Lactic acid production from Lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology* 2011; 156: 286- 301.

(8) Kadam SR., Patil SS., Bastawde KB., Khire JM., Gokhale DV. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii NCIM 2365* for lactic acid production. *Process Biochemistry* 2006; 41: 120- 26

www.SID.ir

Archive of SID

(9) Hetenyi K., Nemeth A., Sevella B. Role of pH-regulation in lactic acid fermentation: Second steps in a process improvement. *Chemical Engineering and processing* 2011; 50: 293- 9.

(10) Giraffa G., Chanishvili N., Widyastuti Y. Improtance of *Lactobacilli* in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology* 2010; 161: 480- 7.

(11) Canchaya C., Claesson MJ., Fitzgerald GF., Sinderen DV., Otoole PW. Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Departement of Microbiology and Alimentary Pharmabiotic center* 2006; 152: 3185- 96.

(12) Hammes WP., Hertel CH. Genus *Lactobacillus*. In: Whitman WB., Vos pD., Garrity GM., Jones D., Krieg NR., Ludwig W., et al. editors. *Bergey s manual of systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York: University of Georgia; 2009: 465- 511.

(13) Singh S., Goswami P., Singh R., Heller KJ. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT-Food Science and Technology* 2009; 42: 448- 57.

(14) The United States Pharmacopeial convention. The national formulary. Washington: Board of trustees; 2000.

(15) International Standard No. 9232- Yogurt- Identification of characteristic microorganisms *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* and *Sterptococcus thermophilus* 2003.

(16) International Standard No. 21571- Foodstuffs-Method of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products nucleic acid extraction 2005.

(17) Ghobadi Dana M. Isolation and molecular identification of naturally occurring Lactobacilli from some Iranian local yoghurt and analysis of their properties by proteomics [Dissertation]. Tehran: *National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology*; 2010.

(18) Ghobadi Dana M., Yakhchali B., Salmanian AH., Rastgarjazi Jazii F. High level acetaldehyde production by an indigenous *Lactobacillus* strain obtained from traditional dairy products of Iran. *African Journal of Microbiology Research* 2011; 5 (25): 4398- 405.

(19) Michelson T., Kask K., Jogi E., Talpsep E., Suitso I., Nurk A. L (+) -Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii ssp*. *Lactis* DSM 20073. *Enzyme and Microbial Technology* 2006; 39: 861-7.

(20) Sanchez-Machado DI., Lopez-Cervantes J., Martinez-Cruz O. Quantification of organic acids in fermented shrimp waste by HPLC. *Food Technology and Biotechnology* 2008; 46 (4): 456- 60.

(21) Ishola RO., Tayo BC. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented food for Bio-molecules production. *Technical Report* 2012; 15 (4): 205- 17.

(22) Trontel A., Batusic A., Gusic I., Slavica A., Santek B., Novak S. Production of D- and L-Lactic acid by mono-and mired cultures of *Lactobacillus sp*. *Food Technology and Biotechnology* 2011; 49 (1): 75- 82.

(23) Panesar P., Kennedy J., Knill CJ., Kosseva M. Production of L (+) Lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2010; 53 (1): 219- 26.

(24) Vodnar DC., Venus J., Schneider R., Socaciu c. Lactic acid production by *Lactobacillus paracasei 163* in discontinuous fermentation using lucerne green juice as nutrient substitute. *Chemistry of Engineering and Technology* 2010; 33 (3): 468- 74.

(25) Mirdamadi S., Rajabi A., Aziz Mohseni F., Moomem B. Lactic acid production by *Lactobacillus* various strains. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology* 2007; 2 (3): 57- 64.

www.SID.ir

Archive of SID

(26) Moon SK., Wee YJ., Choi GW. A novel lactic acid bacterium for the production of high purity L-Lactic acid, *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei CHB2121*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2012; 114 (2): 155- 9.

(27) Sarmast Ghahfarokhi E., Mobini Dehkordi M., Beheshtimaal K. Isolation and evalution of lactic acid production content in native *Lactobacillus* of Chaharmahal va Bakhtiari province isolated from dairy products. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1 (3): 41- 52.

(28) Jayalalitha V., Balasundaram B., Dhanalakshmi B. Molecular identification of *Lactobacilli* in milk. *National Seminar on Current Perspectives in Biological Siences* 2013; 12 (7): 56- 8.

(29) Kwon HS., Yang EH., Yeon SW., Kang BH., Kim TY. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters* 2004; 239: 267- 75.

[1]- 2-hydroxypropionic acid
[2]- Scheele
[3]- *Lactobacillus*
[4]- Lactobacillace
[5]- Firmicutes
[6]- Microaerophile
[7]- Homofermentative
[8]- Heterofermentative
[9]- MRS agar
[10]- HCl
[11]- Merck
[12]- Nicotinamide adenine dinuclotide hydrogen
[13]- Denatyring
[14]- Annealing
[15]- Elongation
[16]- National Center for Biotechnology Information (NCBI)
[17]- *Lactobacillus paracasei*
[18]- Polylactic acid (PLA)
[19]- High-performance liquid chromatography (HPLC)
[20]- Gas chromatography (GC)
[21]- Colorimetric
[22]- Ishola and Tayo
[23] - Trontel
[24]- Pansar
[25] -*Lactobacillus casei*
[26] -Vodnar
[27] - *Lactobacillus paracasei 168*
[28] -Mirdamadi
[29]- *Lactobacillus ramnosus*
[30] -*Lactobacillus plantarum LPF2*
[31] -*Lactobacillus fermentum LFN7*
[32] - *Lactobacillus amilovorus*
[33] - Moon
[34] - Sarmast Ghahfarokhi
[35] - Bergey 's
[36] - Tannock

www.SID.ir

Archive of SID

Screening local *Lactobacilli* from Iran in terms of production of lactic acid and identification of superior strains

Fatemeh Soleimanifard
M.Sc Student of Microbiology, Islamic Azad University, Arak, Iran, soleimanif@ymail.com
Maryam Ghobadi Dana *
Assistant Professor of Molecular Genetic, Standard Research Institute, Karaj, Iran, dana.m@standard.ac.ir
Zahra Piravivanak
Assistant Professorof Food Industry, Standard Research Institute, Karaj, Iran, zpiravi@gmail.com

Abstract

Introduction: *Lactobacilli* are a group of lactic acid bacteria that their final product of fermentation is lactic acid. The objective of this research is selection of local *Lactobacilli* producing L (+) lactic acid.

Materials and methods: In this research the local strains were screened based on the ability to produce lactic acid. The screening was performed in two stages. The first stage was the titration method and the second stage was the enzymatic method. The superior strains obtained from titration method were selected to do enzymatic test. Finally, the superior strains in the second stage (enzymatic) which had the ability to produce L(+) lactic acid were identified by biochemical tests. Then, molecular identification of strains was performed by using *16S rRNA* sequencing.

Results: In this study, the ability of 79 strains of local *Lactobacilli* in terms of production of lactic acid was studied. The highest and lowest rates of lactic acid production was 34.8 and 12.4 mg/g. Superior *Lactobacilli* in terms of production of lactic acid ability of producing had an optical isomer L(+), the highest levels of L(+) lactic acid were with 3.99 and the lowest amount equal to 1.03 mg/g. The biochemical and molecular identification of superior strains showed that strains are *Lactobacillus paracasei*. Then the sequences of *16S rRNA* of superior strains were reported in NCBI with accession numbers KF735654 ،KF735655 ،KJ508201and KJ508202.

Discussion and conclusion: The amounts of lactic acid production by local *Lactobacilli* were very different and producing some of these strains on available reports showed more products. The results of this research suggest the use of superior strains of *Lactobacilli* for production of pure L(+) lactic acid.

Key words: Screening, *Lactobacillus*, Lactic acid, PCR

* Corresponding author
Received: June 25, 2014 / **Accepted:** August 26, 2014

www.SID.ir