Archive of SID

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 15, No. 2, June. July. 2019, p. 323- 339

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 15، شماره 2، خرداد-تیر 1398 ص.339-323

شناسایی فلور لاکتیکی هویج تخمیری با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی و بررسی روابط خویشاوندی به کمک آنالیز فیلوژنتیکی

محمدابراهیم گوهرجو[1]- محمدرضا عدالتیان دوم[2*]- فخری شهیدی[3]- فریده طباطبایی یزدی[3]- محمد جواد وریدی[3]

تاریخ دریافت: 1397/01/22
تاریخ پذیرش: 1397/10/09

چکیده

هویج تخمیری نوعی شوری تهیه شده از هویج و نمک است که سرشار از ویتامین‌ها می‌باشد. هدف از این پژوهش، بررسی تنوع زیستی باکتری‌های اسید لاکتیک فرآورده طی دوره نگهداری و رسیدگی بود. بدین منظور پس از تولید هویج تخمیری، تنوع باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در فرآورده در شش تناوب زمانی بررسی گردید. 144 جدایه گرم مثبت و کاتالاز منفی، جداسازی شده که از میان آنها، 48 جدایه گرم مثبت و کاتالاز منفی انتخاب شدند. آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شامل رشد در دماهای 10 و 45 درجه سانتی گراد، در 6/5 درصد نمک طعام، در pH= 4/4 و pH= 9/6، وتولید گاز دی‌اکسیدکربن از قند گلوکز انجام پذیرفت. در مرحله بعد، شناسایی بر اساس پروفایل تخمیر کربوهیدرات (ده قند)، منجر به شناسایی جنس‌های پدیوکوکوس (2 مورد)، لویکونوستوک (10 مورد)، لاکتوباسیلوس (33 مورد) و انتروکوکوس (2 مورد) و یک مورد هم شناسایی نگردید و در مجموع 19 گونه مختلف گردید. در پایان، 26 جدایه از مجموع 48 جدایه توسط تعیین توالی ژن 16S rDNA تا سطح جنس و گونه شناسایی شدند. نتایج توالی‌یابی منجر به شناسایی گونه‌های ذیل گردید: *Lactobacillus plantarum* (33/34%)، *Leuconostoc mesenteroides* (14/85%)، *Lactobacillus.brevis* (29/63%)، *Lactobacillus.casei* (3/7%)، *Lactobacillus.pantheris* (3/7%)، *Lactobacillus paracasei* (3/7%) و سه ایزوله تا مرحله جنس به‌عنوان لاکتوباسیلوس شناسایی شدند. *لویکونوستوک مزنتروویدس* در مراحل اولیه تخمیر با توجه به نتایج توالی‌یابی و مولکولی غالب بوده که به تدریج در مراحل پایانی توسط *لاکتوباسیلوس برویس* جایگزین گردید. آنالیز فیلوژنتیک وجود سه خوشه را نشان داد، به‌طوریکه خوشه اول شامل دو جنس لوکونستوک و لاکتوباسیلوس، خوشه دوم شامل *لاکتوباسیلوس برویس* و خوشه سوم شامل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بوده است.

واژه‌های کلیدی: تنوع زیستی، باکتری‌های اسید لاکتیک، هویج، تخمیر، فیلوژنی.

مقدمه

تخمیر از زمان‌های قدیم به‌عنوان یک روش آسان برای نگهداری و جلوگیری از فساد میوه‌ها و سبزی‌ها و یا بهبود خواص تغذیه‌ای و ویژگی‌های حسی مطلوب مورد استفاده قرار گرفته است. نگهداری سنتی سبزی‌ها و میوه‌ها به‌وسیله فرایند تخمیر علاوه بر افزایش زمان ماندگاری، فواید بسیاری دارد. تکثیر باکتری‌های اسید لاکتیک در سبزی‌های تخمیر شده علاوه برافزایش قابلیت هضم این سبزی‌ها، میزان ویتامین‌ها را نیز افزایش داده، مواد ضدمیکروبی تولید می‌نماید و باعث تقویت رشد فلور میکروبی مفید در سراسر روده می شود (Grosu-tudor and Zamfir, 2011).

دانش موجود در خصوص میکروارگانیسم‌های دخیل در تخمیر بسیاری از سبزی‌ها هنوز به داده‌های حاصل از آزمایش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژی کلاسیک وابسته است. در حال حاضر به‌کارگیری روش‌های مولکولی در زمینه شناسایی میکروب‌ها امکان درک بهتر بوم‌شناسی تخمیرهای غذایی را فراهم آورده است (Mohania *et al.*, 2008).

هویج حاوی ویتامین‌ها، نمک‌های معدنی و فیبرهای رژیمی، سرشار از فلاوونوئیدها و کاروتنوئیدها است که برای جلوگیری از بسیاری بیماری‌ها مفید می‌باشند (Lampe, 1999). شاید بتوان با تولید نوعی از هویج تخمیری مصرف این محصول با ارزش را به‌عنوان چاشنی غذایی افزایش داد.

باکتری‌های بومی آغازگر هر کشور جزء ذخایر ژنتیکی آن محسوب می‌شوند که نقش عمده‌ای در تولید و ایجاد ویژگی‌های ارگانولپتیکی فرآورده‌های تخمیری دارند. هدف از انجام این مطالعه، شناسایی فلور لاکتیکی هویج تخمیری، به‌منظور معرفی سویه‌های بومی این فرآورده بوده، که می‌توانند در سطح تجاری (صنعت) استفاده شوند و ممکن

1، 2 و 3- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

(* - نویسنده مسئول: Email: edalatian@um.ac.ir)

DOI: 10.22067/ifstrj.v15i2.71386

www.SID.ir

Archive of SID

است برخی از آنها به‌عنوان پروبیوتیک مطرح باشند و در مرحله بعد مقایسه نتایج حاصل از روش‌های بیوشیمیایی با روش‌های مولکولی مبتنی بر کشت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تولید فرآورده

هویج پوست‌گیری شده از فروشگاه بامدادان در مشهد تهیه گردید و با دستگاه خردکن موجود در پایلوت پلنت صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد، رنده شد. در شرایط بهداشتی هویج رنده شده در ظروف800 گرمی پلاستیکی مناسب با ایجاد شرایط بی‌هوازی بسته‌بندی گردیدند. به این صورت که ظروف پس از پر شدن توسط دسته هاون استریل جهت خارج شدن هوا فشرده گردید. تعداد 72 عدد نمونه تهیه شد. پس از 12 ساعت درب ظروف محکم بسته شده از هر سری نمونه دو عدد برای انجام آزمایش‌های روز اول کنار گذاشته شد و بقیه نمونه‌ها در دمای 25 تا 27 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

شمارش تعداد کل باکتری‌های اسید لاکتیک هوازی و میکروآئروفیلیک

شمارش کلی باکتری‌های اسید لاکتیک بر اساس استاندارد ملی 5484 که با استانداردهای بین‌المللی مطابقت دارد انجام پذیرفت. به‌منظور ایجاد شرایط میکروآئروفیلیک برای شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیک میکروآئروفیلیک از گاز پک نوع A وجار بی‌هوازی استفاده شد (Şengül, 2006). در این مرحله پلیت‌هایی که دارای 30 تا 300 کلنی بودند، انتخاب و جهت شمارش بر حسب CFU/g محاسبه گردید. سپس از داده‌ها به کمک معادله زیر نسبت به محاسبه شمارش کلی باکتری‌های اسید لاکتیک استفاده شد (یاورمنش و همکاران، 1386).

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \quad (1)$$

∑C: مجموع کلنی‌ها در دو رقت متوالی، N1: تعداد پتری‌ها (ظرف کشت) اولین رقت، N2: تعداد پتری‌ها (ظرف کشت) دومین رقت، d: ضریب رقت در اولین رقت.

جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک

با توجه به اینکه تخمیرهای گیاهی بسته به شرایط حدود 7 تا 28 روز زمان لازم دارند (سعیدی، 1392) دوره تخمیر هویج تخمیری نیز 32 روز در نظر گرفته شد. جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از هویج تخمیری تحت شرایط کاملا بهداشتی در تناوب‌های زمانی (صفر، 4، 8، 16، 24 و 32) روزانجام پذیرفت.

مراحل جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌ها

نمونه‌برداری

در هر یک از تناوب‌های زمانی پس از تخمیر از12 ظرف نمونه‌برداری گردید، بدین صورت که تحت شرایط استریل درب ظروف باز و 10 گرم از هر نمونه توزین و 90 سی‌سی محلول سرم فیزیولوژی استریل به آن اضافه شد (برای رقت‌سازی)، این مخلوط داخل کیسه پلاستیکی استریل مخصوص دستگاه استومکر به مدت 5 دقیقه توسط دستگاه استومکربا دور 260 rpm همگن گردید، محلول حاصل در شرایط استریل به ارلن‌های استریل جهت تهیه رقت‌های بعدی منتقل گردید (تا رقت10^{-7})، 0/1 میلی‌لیتر از هر رقت در پتری دیش‌های یکبار مصرف استریل به قطر 8 سانتی‌متر حاوی محیط کشت اختصاصی جهت جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک یعنی MRS Agar (در دو تکرار) کشت سطحی به‌عمل آمد. یک سری از پلیت‌ها در دماهای (1±30 و 1±45) با استفاده از جار بی‌هوازی و گاز پک و سری دیگر در شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری شدند (Saeedi *et al.*, 2015؛ Tamang *et al.*, 2005).

جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌ها بر روی محیط کشت MRS Agar

پس از گذشت 24 تا 72 ساعت پرگنه‌های تشکیل شده در محیط‌های مختلف از نظر مورفولوژیکی، رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز مورد بررسی قرار گرفتند، سپس پرگنه‌هایی که با انجام آزمایش‌های اولیه به نظر می‌رسید جزء باکتری‌های اسید لاکتیک باشند (یعنی گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند) انتخاب و از آنها در محیط کشت اختصاصی مذکور جهت خالص‌سازی بیشتر کشت خطی به‌عمل آمد. به این ترتیب کشت باکتری‌ها خالص شده و پرگنه‌های تک از هر جدایه بدست آمد.

شناسایی اولیه باکتری‌های اسید لاکتیک

پیش از شروع آزمایش‌ها به‌منظور فعال‌سازی، هر سویه در 10-5 میلی‌لیتر محیط کشت MRS Broth، به مدت 24 ساعت و در دمای 30 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. به‌منظور شناسایی ویژگی‌های فنوتیپی رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز استفاده شد. این دو آزمون به‌منظور جداسازی باکتری‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی انجام پذیرفت.

آزمایش کاتالاز

لوپ کوچکی از کشت تازه هر یک از جدایه‌ها بر روی لام قرار گرفت و سپس یک قطره از آب اکسیژنه 3 درصد به آن اضافه گردید و واکنش کاتالاز و تشکیل حباب بررسی شد (Tamang *et al.*, 2007).

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به‌منظور شناسایی کلنی‌های خالص شده

شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها در سطح جنس

رشد در دمای 15 و 45 درجه سانتی‌گراد طی 7 روز: در این مرحله جدایه‌ها در محیط کشت MRS Broth به مدت 48 ساعت کشت و سپس یک لوپ از این محیط به لوله‌های حاوی محیط MRS Broth منتقل و در دماهای مورد نظر گرمخانه‌گذاری گردید. ایجاد کدورت در محیط نشان‌دهنده رشد باکتری در شرایط مذکور می‌باشد (Ebing and Rutgers, 2006).

رشد در غلظت نمک 6/5% نمک طعام: جهت بررسی رشد در غلظت مورد نظر نمک، جدایه‌ها را در محیط کشت MRS Broth و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت گرمخانه‌گذاری و سپس یک لوپ از این محیط به لوله‌های حاوی MRS Broth با غلظت مورد نظر نمک طعام منتقل و به مدت 7 روز در دمای 37 درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شد. ایجاد کدورت در محیط نشان‌دهنده رشد باکتری در شرایط مذکور می‌باشد (Ebing and Rutgers, 2006).

رشد در pH= 4/4 و pH= 9/6:رشد با روش مذکور در دو pH مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور تنظیم pH از اسید کلریدریک و سود یک نرمال استفاده شد. قابل ذکر است که تنظیم pH محیط پس از اتوکلاو کردن آن صورت پذیرفت (Duan *et al*., 2008).

بررسی توانایی تولید گاز CO_2 از گلوکز: برای انجام این آزمون از MRS براث و لوله‌های دورهام وارونه استفاده شد. 50µl از کشت‌های 24 ساعته به 8 میلی‌لیتر محیط کشت آزمون منتقل شد. بعد از گرمخانه‌گذاری برای 5 روز گاز تجمع‌یافته در لوله‌های دورهام به‌عنوان شاهد تولید گاز از گلوکز در نظر گرفته شد (Nikita and Hemangi, 2012). جهت گروه‌بندی جدایه‌های مشابه رشد در دمای 10و 45 درجه سانتی‌گراد (به مدت 3 تا 5 روز)، رشد در غلظت 6/5 درصد نمک طعام و رشد در pHهای 4/4 و 9/6 در محیط کشت MRS Broth وتولید یا عدم تولید گاز CO_2 توسط لوله دورهام مورد بررسی قرار گرفت (Tamang *et al*., 2005).

تخمیر کربوهیدرات‌ها

برای این منظور لوله‌های حاوی محیط کشت Phenol Red Broth Base حاوی یک درصد قند مورد نظر (گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز، مانیتول، سوربیتول، ملیبیوز، مالتوز، ساکارز، لاکتوز و رافینوز) تهیه گردید. بدین صورت که ابتدا محلول 10 درصد قند تهیه و 0/5 میلی‌لیتر از محلول قندی مورد نظر با عبور از فیلتر سرنگی 0/45 به لوله حاوی 4/5 میلی‌لیتر محیط کشت پایه افزوده شد. رنگ محیط کشت قرمز بود، ظاهر شدن رنگ زرد پس از 72 ساعت از شروع گرمخانه‌گذاری نشان‌دهنده تخمیر قند بود (Fitzsimons *et al*., 1999).

شناسایی با استفاده از روش‌های مولکولی

استخراج DNA **جدایه‌ها**

از 49 جدایه مختلف که بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی و تخمیر قند، شناسایی و گروه‌بندی شدند، 27جدایه بر اساس مشابهت در خصوصیات بیوشیمیایی برای شناسایی مولکولی انتخاب گردیدند.

جهت استخراج DNA جدایه‌ها از کیت استخراج High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche، آلمان) استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون اولیه هر جدایه در شروع کار، هر یک از جدایه‌ها به 5 میلی‌لیتر محیط کشت MRS Broth تلقیح و پس از 24 ساعت گرمخانه‌گذاری در 30 درجه سانتی‌گراد، از 500 میکرولیتر از این سوسپانسیون برای ادامه کار مورد استفاده قرار گرفت. همه مراحل مطابق دستورالعمل کیت انجام پذیرفت. در پایان برای هر جدایه محلول 200 میکرولیتری حاوی DNA جدایه به‌دست آمد، که برای انجام مراحل بعد در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

انجام عملیات PCR **و تکثیر ناحیه ژن** 16S rRNA

هر مخلوط واکنش 50 میکرولیتر حجم داشت که اجزای آن شامل مستر میکس 25 میکرولیتر، DNA الگو 2 میکرولیتر، پرایمر پیش‌رو و معکوس هر کدام یک میکرولیتر و آب مقطر 21 میکرولیتر بود. برای تعیین توالی ژن 16S rRNA در جدایه‌هایی که DNA آنها استخراج شده بود از پرایمرهای یونیورسال پیش‌رو 27F (AGAGTTTGATYMTGGCTCAG) و معکوس 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) استفاده گردید. به‌طوری که محصول به‌دست آمده 1500 جفت باز طول داشت (Taheri *et al*., 2009).

پرایمرهای مورد استفاده طبق دستور العمل شرکت سازنده (فرمنتاز) با آب مقطر دو بار تقطیر استریل تا رقت 25 پیکومول بر میکرولیتر رقیق و در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (سعیدی، 1392).

مخلوط اصلی واکنش PCR پس از تهیه در میکروتیوب‌های 200 میکرولیتری ریخته شد و واکنش PCR به‌صورت مرحله اول فعال‌سازی[1] یا دناتوراسیون اولیه (95°C به مدت 5 دقیقه)، مرحله دوم (مرحله دناتوراسیون یا واسرشته‌سازی[2] 94°C به مدت 30ثانیه)، مرحله

1 Activation

2 Denaturation

www.SID.ir

Archive of SID

سوم (مرحله اتصال[3]) دمای 56/5°C بهمدت 30 ثانیه، مرحله چهارم (توسعه[4]) دمای 72°C به مدت 2 دقیقه و مرحله پنجم (توسعه نهایی[5]) دمای 72°C به مدت 10 دقیقه انجام پذیرفت (Taheri *et al*.,2009; Platero *et al*., 2009).

الکتروفورز محصول PCR

بررسی محصولات PCR روی ژل آگارز 1/5درصد(W/V) در بافر TBE.1X صورت گرفت. برای این منظور 2/5 میکرولیتر از محصول واکنش PCR (آمپلیکون) و همچنین 5 میکرولیتر لدر[6] به چاهک‌ها انتقال یافت. یک چاهک به‌عنوان کنترل منفی (محصول واکنش PCR فاقد DNA) در نظر گرفته شد. الکتروفورز به مدت 40 دقیقه با ولتاژ 90 ولت انجام پذیرفت. سپس ژل آگارز در دستگاه ژل داک قرار گرفت و تشکیل باند bp 1500 بررسی شد (Alegría *et al.*, 2009).

تخلیص محصولات PCR

به‌منظور تعیین توالی محصولات PCR نیاز به تخلیص آنها می‌باشد. تخلیص نمونه‌ها توسط شرکت ماکروژن کره انجام گرفت.

تعیین توالی جدایه‌ها

جدایه‌ها جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردیدند.

رسم درخت فیلوژنتیکی

ابتدا محصولات PCRها جهت توالی‌یابی (یک‌طرفه با کمک پرایمر 27F) به شرکت سکانس‌کننده Macrogen کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت نتایج توالی‌یابی برای 27 ایزوله باکتری اسید لاکتیک، نتایج، ابتدا در NCBI، Blast شد و سویه‌هایی که درصد مشابهت آنها بالای 97% بود، به‌عنوان همانگونه شناسایی گردید. در ضمن آن دسته از سویه‌ها که در Blast اول، درصد مشابهت پایین‌تر از 97% داشتند، آن سویه‌ها جهت توالی‌یابی مجدد به شرکت مربوطه ارسال گردید و نتایج توالی‌یابی مجدد آنها دریافت و ثبت شد. در مرحله بعد برای رسم درخت فیلوزنتیک، ابتدا سکانس‌ها (فایل txt آنها) در داخل نرم‌افزاری به نام Clustal Omega، به فرمت Fasta، کپی گردید، سپس درخت فیلوژنتیک در داخل این نرم‌افزار به حالت Cladogram، رسم شد. در مرحله بعد فایل Multiple Alignment (هم‌ردیفی چندتایی) روی کامپیوتر ذخیره، سپس این فایل با نرم‌افزار Clustal X باز و درخت فیلوژنتیک را با این نرم‌افزار (Boot strap، 1000) رسم گردید. در نهایت درخت فیلوژنتیک رسم شده با نرم‌افزار Fig Tree Version 4، باز و ویرایش شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

پس از انجام رنگ‌آمیزی گرم و بررسی مورفولوژی جدایه‌ها و نیز انجام تست کاتالاز، 144 جدایه از مراحل مختلف تخمیر هویج تخمیری که گرم مثبت و کاتالاز منفی بوده و ویژگی‌های مورفولوژیکی و شکل کلنی‌های آنها با باکتری‌های اسید لاکتیک همخوانی داشت جدا گردیدند. از بین آنها بر اساس ویژگی‌های مورفولوژی کلنی‌ها، 48 جدایه انتخاب و بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی در حد جنس شناسایی شدند (جدول 1).

جدول1- نتایج آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های هویج تخمیری (بر اساس منبع:Patil *et al*., 2010، Saeedi *et al*., 2015)

شماره گروه	درصد فراوانی حضور	رشد در pH=9.6	رشد در pH=4.4	رشد در 6/5% نمک	رشد در دمای 10℃	رشد در دمای 45℃	تولید گاز	جنس احتمالی
1	4/08	-	+	+	-	-	-	**پدیوکوکوس**
2	34/69	±	+	±	+	-	-	**لاکتوباسیلوس هوموفرمانتاتیو**
3	36/74	+	-	-	+	±	+	
4	20/41	-	±	±	+	-	+	**لاکتوباسیلوس هتروفرمانتاتیو**
5	4/08	+	+	+	+	+	-	**لوکونوستوک انتروکوکوس**

بر این اساس گروه یک، کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و هوموفرمنتاتیو با آرایش سلولی تتراد بودند که در دمای 10°C و pH= 9/6 رشد نکردند، اما قادر به رشد در حضور 6/5 درصد نمک بودند، لذا احتمالا متعلق به جنس پدیوکوکوس هستند.گروه دوم باسیل‌های هوموفرمنتاتیوی بودند که در دمای 10°C و pH=4/4 قادر به رشد نبوده، این گروه به‌عنوان لاکتوباسیلوس‌های هوموفرمنتاتیو در نظر گرفته شدند. گروه سوم شامل باسیل‌های هتروفرمنتاتیوی بودند که در دمای 10°C و pH= 9/6 به‌خوبی رشد کردند، این گروه به‌عنوان

3Annealing
4 Extension
5 Final Extension
6 Ladder

www.SID.ir

Archive of SID

لاکتوباسیلوس‌های هتروفرمنتاتیو در نظر گرفته شدند. در گروه چهارم کوکسی‌هایی کاتالاز منفی و هتروفرمنتاتیوی قرار داشتند که در دمای 10°C قادر به رشد بوده، اما در pH=9/6 رشد نکردند، این گروه به‌عنوان جنس لوکونوستوک در نظر گرفته شدند.کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، هوموفرمنتاتیو قادر به رشد در دمای 45°C و به غلظت 6/5 درصد نمک، که در pH=4/4 و pH= 9/6 نیز رشد کردند در گروه پنج به‌عنوان جنس انتروکوکوس جای گرفتند (Axelsson, 2004؛ Tamang *et al*., 2005؛ Schleifer, 2009؛ Patil *et al*., 2010).

نتایج آزمایش تخمیر کربو هیدرات‌های مختلف

شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک که صرفا بر پایه آزمایش‌های بیوشیمیایی استوار باشد ممکن است باعث تشخیص اشتباه گردد. زیرا این باکتری‌ها در بسیاری از ویژگی‌ها مشترک هستند (Giraffa *et al*., 2004). نتایج حاصل از تخمیر کربوهیدرات‌ها صرفا برای گروه‌بندی جدایه‌ها استفاده شد تا بر اساس این نتایج از هر گروه چند جدایه جهت شناسایی دقیق با روش مولکولی انتخاب شوند. نتایج حاصل از تخمیر ده قند گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز مانیتول، سوربیتول، ملیبیوز، مالتوز، ساکارز، لاکتوز و رافینوز جدایه‌های هویج تخمیری در جدول 2، آمده است. بر اساس جلد سوم کتاب Bergey's manual of systematic bacteriology و نیز نتایج حاصل از آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و تخمیر قندهای مختلف، جنس و گونه باکتری‌ها مشخص و در جدول 2، ملاحظه می‌گردد. از میان 47 ایزوله مورد آزمون، جنس‌های پدیوکوکوس (2 مورد)، لویکونوستوک (10 مورد)، لاکتوباسیلوس (33 مورد) و انتروکوکوس (2 مورد) را به‌خود اختصاص دادند.که در این میان، گونه‌های *Lactobacillus kimchi* و *Lactobacillus parakefiri* نیز به چشم می‌خورند. از نزدیک‌ترین محصولات به محصول هویج تخمیری، سالاد زمستانی[7] (Saeedi *et al*., 2015) و کیمچی، یک محصول کره‌ای تخمیری سبزیجات، می‌باشند به‌طوریکه فلور لاکتیکی عمده شناسایی شده در تخمیر کیمچی متعلق به جنس‌های ویسلا، لویکونوستوک، لاکتوباسیلوس و به میزان کمتر پدیوکوکوس و انتروکوکوس می‌باشند (Choi *et al*., 2002؛ Lee *et al*., 2002). همانطور که ملاحظه می‌شود بیشترین فراوانی مربوط به جنس لاکتوباسیلوس و در داخل این جنس، گونه‌های پلانتاروم و برویس به تعداد بیشتری دیده می‌شوند که با توجه به خاستگاه گونه‌هایی مانند پلانتاروم که گیاهی می‌باشد، امری منطقی به نظر می‌رسد.

همانطور که در جدول شماره 3 مشاهده می گردد، تعداد و فراوانی جنس و گونه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک شناسایی شده بر اساس روش تخمیر قند، به تفکیک مراحل مختلف تخمیر هویج آورده شده است. در بین جنس‌های شناسایی شده، جنس لاکتوباسیلوس بیشترین تنوع گونه‌ای را به‌خود اختصاص داده است و در بین گونه‌ها، گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بیشترین فراوانی (9 مورد) را دارا می‌باشد. در مجموع از 49 ایزوله، آزمون با روش تخمیر قند تعداد 48 ایزوله با این روش شناسایی شده و یک ایزوله (ایزوله شماره 161) شناسایی نگردید.

اثر زمان تخمیر بر رشد باکتری‌های اسید لاکتیک در کل زمان فرآیند تخمیر

نتایج حاصل از اثر زمان تخمیر بر رشد باکتری‌های اسید لاکتیک بر حسب Log CFU/g در طی 32 روز زمان تخمیر در شکل 1، آمده است.

نتایج حاصل از اثر زمان تخمیر بر رشد باکتری‌های اسید لاکتیک در کل فرآیند تخمیر نشان داد که رشد باکتری‌های اسید لاکتیک از روز اول تا روز شانزدهم ($p<0/01$) افزایش و از روز شانزدهم تا بیست و چهارم کاهش یافته بود. از روز بیست و چهارم تا سی و دوم اختلاف معنی‌داری در رشد آنها مشاهده نشد. نتایج حاصل از تغییرات اسیدیته و pH در طی زمان تخمیر در شکل 2، نشان داده شده است.

رشد باکتری‌های اسید لاکتیک به‌طور پیوسته تا روز شانزدهم افزایش و از روز شانزدهم به بعد روند کاهشی پیدا کرد این موضوع ممکن است به این دلیل باشد که تا روز شانزدهم به دلیل کافی بودن مواد مغذی و pH مناسب برای رشد، میکروارگانیسم‌ها فعالیت نموده و در نتیجه اسیدیته افزایش و pH فرآورده تخمیری کاهش یافته است ($P<0/05$) (شکل 1) (سعیدی، 1392). اما بعد از روز شانزدهم با کم شدن مواد مغذی و نامناسب شدن pH فرآورده تخمیری رقابت بین میکروارگانیسم‌ها افزایش یافته و از سرعت رشد باکتری‌های اسید لاکتیک کاسته می‌شود.

شناسایی جدایه‌های بر گزیده با روش مولکولی

پس از جداسازی 144 ایزوله با تکیه بر خصوصیات مورفولوژیکی از محیط‌های کشت اختصاصی لاکتوباسیلوس‌ها، تعداد 47 جدایه بر اساس آزمون‌های تخمیر قند شناسایی شدند.

7 Winter Salad

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 2- نتایج حاصل از پروفایل تخمیر کربوهیدرات‌ها توسط جدایه‌ها (بر اساس منبع جلد سوم کتاب Bergey's manual of systematic bacteriology)

نوع قند / شماره	فروکتوز	گالاکتوز	گلوکز	لاکتوز	مالتوز	مانیتول	ملیبیوز	رافینوز	سوربیتول	ساکارز	نزدیک‌ترین جنس و گونه براساس برگی
2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	*Pediococcus pentosaceus*
3	+	+	+	-	+	d	+	+	-	+	*Leuconostoc mesenteroides*
4	+	+	+	ND	+	+	-	+	+	+	*Lactobacillus coryniformis*
5،6،6،6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	*Lactobacillus paraplantarum (3)*
6	+	d	ND	d	+	d	+	-	-	+	*Leuconostoc mesenteroides*
9	+	+	+	-	+	d	+	+	-	+	*Leuconostoc mesenteroides*
14	+	d	+	d	+	d	+	-	-	+	*Leuconostoc lactis*
16	+	+	+	-	d	-	+	+	-	+	*Lactobacillus brevis*
18	+	-	+	d	+	-	+	-	-	+	*Lactobacillus brevis*
20	+	-	+	-	+	-	d	+	-	-	*Lactobacillus brevis*
27،39، 50، 52، 63، 64، ۷۰،۱۳۷،۱۳۹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*Lactobacillus plantarum* **(9)**
32	+	-	d	-	+	ND	-	-	-	+	*Lactobacillus ferintoshensis*
35	+	+	+	d	-	d	-	-	-	-	*Pediococcus damnosus*
42	+	+	+	-	+	-	d	-	-	+	*Lactobacillus brevis*
44	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	*Lactobacillus kimchi*
48	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	*Leuconostoc mesenteroides*
53	+	+	+	+	ND	+	-	-	+	-	*Lactobacillus paracasei*
60	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	*Leuconostoc mesenteroides*
61	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	*Lactobacillus galinarum*
68	+	d	d	ND	+	-	-	-	-	-	*Lactobacillus brevis*
101	+	+	+	+	+	d	+	+	d	+	*Leuconostoc lactis*
105	d	+	+	-	-	-	-	-	d	+	*Lactobacillus acidipiscis*
106	+	+	+	+	d	-	+	-	-	+	*Lactobacillus kimchi*
107	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	*Lactobacillus casei*
112	+	-	+	-	+	-	d	-	-	-	*Lactobacillus acidifarinae*
113	+	+	+	-	+	-	d	-	-	+	*Lactobacillus kimchi*
114	+	+	+	-	-	-	-	-	-	--	*Enterococcus faeccium*
116	+	d	d	-	+	d	-	-	-	+	*Lactobacillus acidifarinae*
123	-	-	+	d	-	d	-	-	-	-	*Lactobacillus amylovorus*
125	ND	ND	+	d	-	ND	-	-	ND	+	*Lactobacillus amylovorus*
127	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	*Lactobacillus coryniformis*
129	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	*Leuconostoc pseudomesenteroides*
142	ND	+	+	-	+	-	+	d	-	+	*Leuconostoc mesenteroides*
145	+	+	+	ND	+	-	-	-	-	-	*Lactobacillus parakefiri*
150	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	*Enterococcus faeccium*
151	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*Leuconostoc lactis*
160	+	+	+	d	+	-	-	ND	-	-	*Lactobacillus parakefiri*
161	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-

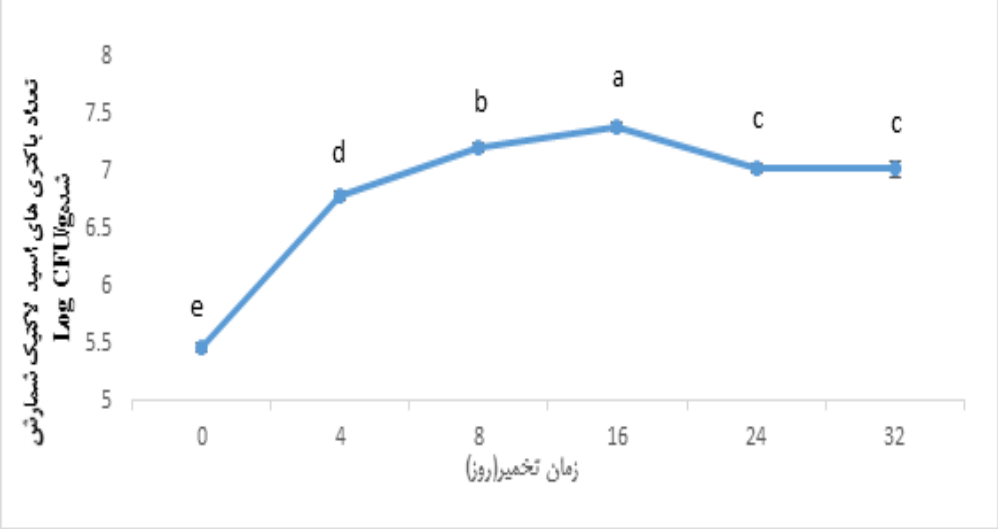
d مشکوک به تخمیر قند، **ND** آزمون انجام نگرفته+ تخمیر شده، **-** تخمیر نشده

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 3- تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک حاصل از پروفایل تخمیر کربوهیدرات‌ها توسط جدایه‌ها به تفکیک جنس و گونه و در مراحل مختلف تخمیر هویج تخمیری

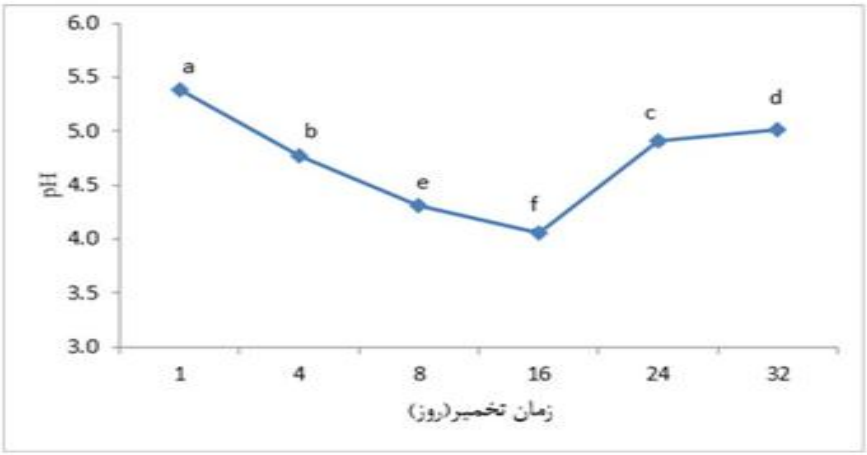
جنس و گونه / مراحل تخمیر		روز صفر	روز 4	روز 8	روز 16	روز 24	روز 32	جمع
Leuconostoc	*mesenteroides*	2	1	1		1	1	6
	pseudomesenteroides		1					1
	lactis	2		1				3
Pediococcus	*pentosaceus*		1					1
	Damnosus					1		1
	coryniformis			1		1		2
	Paraplantarum			1		1	1	3
	brevis	3	1				1	5
	plantarum		1	3	1	1	3	9
	ferintoshensis				1			1
	kimchi		1	1			1	3
Lactobacillus	*Paracasei*			1				1
	galinarum						1	1
	acidipiscis					1		1
	casei		1					1
	acidifarinae						2	2
	amylovorus			1		1		2
	parakefiri					1	1	2
Enterococcus	*faeccium*		1		1			2
جمع کل ایزوله‌ها								47

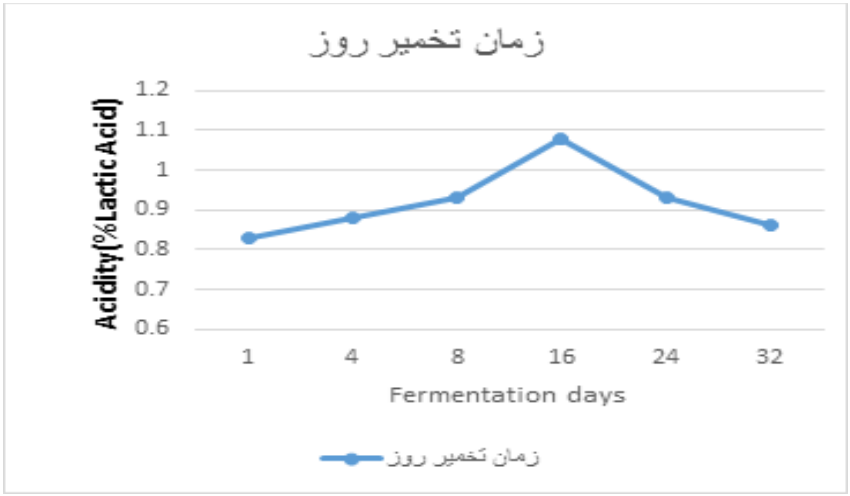


شکل1- اثر زمان تخمیر بر رشد باکتری‌های اسید لاکتیک در کل زمان فرایند تخمیر.

www.SID.ir

Archive of SID





شکل 2- تغییرات کلی pH و اسیدیته هویج تخمیری در طی زمان نگهداری

توالی نوکلئوتیدی 16S rRNA یک مبنای دقیق برای آنالیز فیلوژنتیک و شناسایی فراهم می‌کند. پس از استخراج DNA از جدایه‌ها کیفیت و کمیت مطلوب آن‌ها توسط دستگاه نانودراپ و الکتروفورز تعیین شد و سپس 26، جدایه با توجه به شناسایی بر اساس آزمون‌های فیزیکوشیمیایی و تخمیر قند و همچنین کیفیت و کمیت مطلوب DNA استخراجی انتخاب و عملیات PCR بر روی آنها انجام پذیرفت، در نهایت آمپلیکون‌های به‌دست آمده روی ژل آگارز برده شد (Kermanshahi and Peymanfar, 2012).

همانطور که در شکل 3، مشاهده می‌گردد باندهای حاصل از ژل الکتروفورز PCR جدایه‌های منتخب دارای باندهای مناسب برای توالی‌یابی بود که جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید

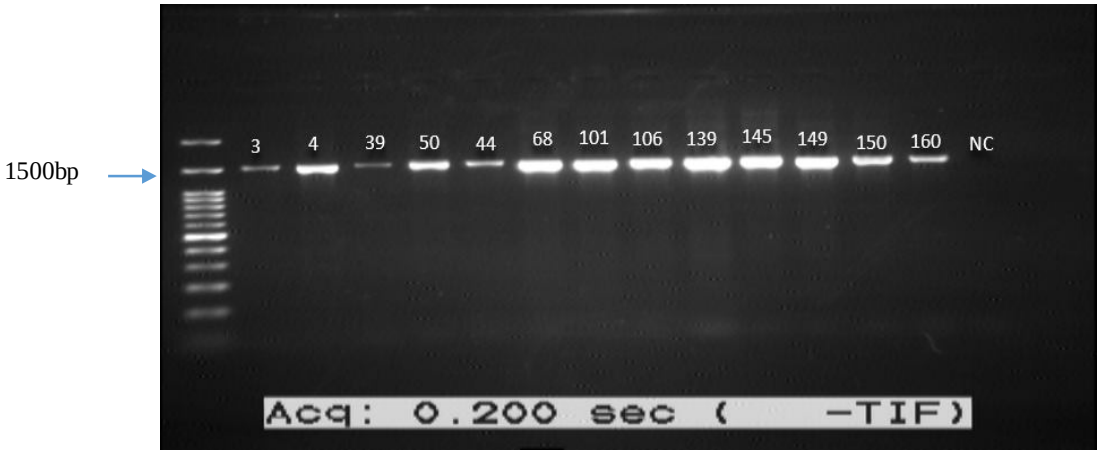
نتایج توالی‌یابی جدایه‌های منتخب توسط شرکت سکانس‌کننده

با توجه به نتایج آنالیز مولکولی در جدول 4، جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (9 مورد)، *لاکتوباسیلوس برویس* (8 مورد) ، *لوکونوستوک مزنتروئیدس* (4 مورد)، *لاکتوباسیلوس کازئی* (یک مورد)، *لاکتوباسیلوس پارکازی* (یک مورد) و *لاکتوباسیلوس پانتریس* (یک مورد)، و دو مورد هم تا سطح جنس شناسایی شدند که متعلق به جنس لاکتوباسیلوس بودند، از مجموع 26 جدایه شناسایی شده به روش مولکولی را به‌خود اختصاص دادند. از نظر تفکیک ایزوله‌ها بر اساس روز تخمیر، نتایج مولکولی به‌صورت ذیل به‌دست آمد: روز صفر، از سه ایزوله (*لویکونوستوک مزنتروئیدس* 2 ، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* 1 مورد)؛ روز 4 تخمیر، از پنج ایزوله (*لویکونوستوک مزنتروئیدس* 1، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* 2، *لاکتوباسیلوس برویس* 2 مورد)؛ روز 8 تخمیر، از پنج ایزوله (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* 2، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* 1، جنس لاکتوباسیلوس 1 و *لویکونوستوک مزنتروئیدس* 1)؛ روز شانزدهم تخمیر، از دو ایزوله (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* 2 مورد)، روز بیست و چهارم، از شش ایزوله (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*2،

www.SID.ir

Archive of SID

لاکتوباسیلوس برویس 2، *لاکتوباسیلوس پنتریس* 1 و *لاکتوباسیلوس کازئی* 1 مورد) و روز سی و دوم از پنج ایزوله (*لاکتوباسیلوس برویس* 4 و جنس لاکتوباسیلوس 1 مورد) ..



3: *Leuconostoc mesenteroides*, 4: *Lactobacillus plantarum*, 39: *Lactobacillus plantarum*, 50: *Lactobacillus plantarum*, 44: *Lactobacillus paracasei*, 68: *Lactobacillus brevis*, 101: *Leuconostoc mesenteroides*, 106: *Lactobacillus brevis*, 139: *Lactobacillus casei*, 145: *Lactobacillus brevis*, 149: *Lactobacillus plantarum*, 150: *Lactobacillus plantarum*, 160: *Lactobacillus brevis* and Negative Control (NC).

شکل 3- باندهای bp**1500 حاصل از تکثیر ژن** 16S rRNA، NC: **کنترل منفی، نشانگر**[1]، 100 bp+3K.

جدول 4-نتایج شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از نمونه‌های هویج تخمیری در طی دوره نگهداری با استفاده از روش مولکولی و مقایسه آن با نتایج حاصل از تخمیر قند

ردیف	کد جدایه	نتیجه توالی‌یابی مجدد	روز نمونه‌گیری	شباهت (%)	نزدیک‌ترین سویه در پایگاه داده NCBI	شناسایی با روش تخمیر قند	شماره دسترسی[2]
1	**G6**		صفر	98	*Leuconostoc mesenteroides* strain KLDS 5.0606	*Leuconostoc mesenteroides*	EU419608.1
2	**G9**		صفر	98	*Leuconostoc mesenteroides* strain SCWL 05	*Leuconostoc mesenteroides*	KM922563.1
3	**G14**	99% *Lactobacillus plantarum* strain KLDS 1.0728	صفر	95	Lactobacillus sp. sy4	*Leuconostoc lactis*	KJ801851.1
4	**G3**		4	97	*Leuconostoc mesenteroides* strain MFL24	*Leuconostoc mesenteroides*	KF697659.1
5	**G35**	98% Lactobacillus sp. sy4	4	96	*Lactobacillus plantarum* strain KLAB1	*Pediococus damnosus*	KM497500.1
6	**G39**	97% *Lactobacillus*	4	97	Lactobacillus sp. sy4	*Lactobacillus plantarum*	KJ801851.1

1 Ladder
[2] Accession Number

www.SID.ir

Archive of SID

					plantarum strain LCN 56		
JX966418.1	*Lactobacillus brevis*	*Lactobacillus brevis* strain NSe1	99	4		**G42**	7
KF246513.1	*Leuconostoc.pseudomesenteroides*	*Lactobacillus brevis* strain p-18	98	4		**G129**	8
KM495889.1	*Lactobacillus coryniformis*	*Lactobacillus plantarum* strain gp86	98	8		**G4**	9
HM151330.1	*Lactobacillus kimchi*	Uncultured Lactobacillus sp.	99	8	96% *Lactobacillus paracasei* strain IIA	**G44**	10
KT025848.1	*Lactobacillus plantarum*	*Lactobacillus plantarum* strain KF	92	8	92% *Lactobacillus plantarum* strain KF	**G50**	11
KJ801851.1	*Pediococcus pentosaceus*	Lactobacillus sp. sy4	95	8	96% Lactobacillus sp. sy4	**G52**	12
KF697619.1	*Leuconostoc lactis*	*Leuconostoc mesenteroides* strain MPL24	99	8		**G101**	13
KR055061.1	*Lactobacillus ferinfoshensis*	*Lactobacillus plantarum* strain CSCWL 6-14	93	16	94% *Lactobacillus plantarum* strain LY21	**G32**	14
EU600920.1	*Lactobacillus gallinarum*	Lactobacillus sp. KLDS 1.0717	99	16	96% *Lactobacillus plantarum* strain LP1-4	**G150**	15
KM495883.1	*Lactobacillus paraplantarum*	*Lactobacillus plantarum* strain gp57	98	24		**G56**	16
AB932522.1	*Leuconostoc mesenteroides*	*Lactobacillus pantheris*	99	24		**G60**	17
KP889229.1	*Lactobacillus coryniformis*	*Lactobacillus brevis* strain FJ004	97	24		**G127**	18
KC568563.1	*Lactobacillus plantarum*	*Lactobacillus casei* strain MRTL3	89	24	92% *Lactobacillus casei* strain a4	**G139**	19
HM162416.1	*Lactobacillus parakefiri*	*Lactobacillus brevis* strain CGMCC_1.2028	97	24		**G145**	20
KC148528.1	*Lactobacillus plantarum*	Lactobacillus sp. CPP1	94	24	96% *Lactobacillus plantarum* strain CMGB-L1	**G149**	21
KM269721.1	*Lactobacillus gallinarum*	Lactobacillus sp. L729(LBF2) C04	99	32	97% Lactobacillus sp. SMG131	**G61**	22

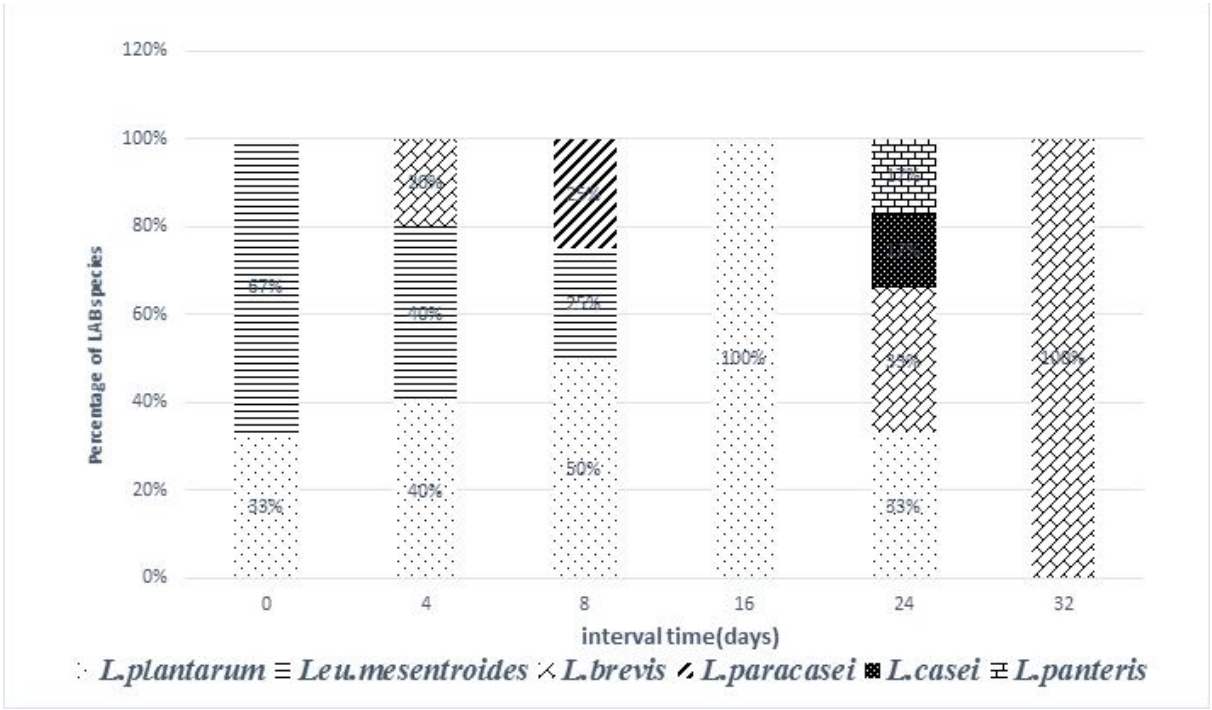
www.SID.ir

Archive of SID

FJ227314.1	*Lactobacillus brevis*	*Lactobacillus brevis* strain bh3	98	32		**G68**	23
KM495917.1	*Lactobacillus kimchi*	*Lactobacillus brevis* strain gp66	95	32	98% *Lactobacillus brevis* strain gp42	**G106**	24
FJ227314.1	*Lactobacillus acidifarinae*	*Lactobacillus brevis* strain bh3	98	32		**G116**	25
AB548886.1	*Lactobacillus parakefiri*	*Lactobacillus brevis*	99	32		**G160**	26

تغییرات و تنوع جنس و گونه‌های فلور لاکتیکی در مراحل تخمیر هویج تخمیری

با وجود اینکه تخمیرهای گیاهی متنوع هستند و فرآورده نهایی بستگی به میکروارگانیسم‌هایی دارد که تخمیر را انجام می‌دهند، اما به‌طور کلی می‌توان گفت که در یک تخمیر گیاهی طبیعی در ابتدا سویه‌های هتروفرمنتاتیو حضور دارند و در ادامه هوموفرمنتاتیوها غالب خواهند شد. کلم ترش یا ساورکراوت از فرآورده‌های تخمیر گیاهی است که مطالعات زیادی در در مورد مراحل تخمیر آن انجام شده است.



شکل 4- تغییرات جنس‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک (بر حسب درصد) طی مراحل مختلف تخمیر

تحقیقات نشان داده است که قندهای اصلی در کلم، گلوکز، فروکتوز و به مقدار کمتر ساکارز هستند. این قندها طی هفته اول تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های هتروفرمنتاتیو به اسید لاکتیک، اسید استیک، مانیتول، اتانول و دی‌اکسید کربن، که برای ایجاد شرایط بی‌هوازی لازم است تبدیل می‌شوند (Bamforth, 2005). در این پژوهش، ابتدا باکتری‌های لوکونوستوک در روزهای اول(زمان صفر) تا هشتم حضور فعال داشتند، ولی از روز هشتم به بعد مشاهده نشدند. عدم حضور جنس لویکونوستوک در روزهای بعدی تخمیر، ممکن است به دلیل کاهش pH، در روزهای ذکر شده باشد (شکل2). زیراکه گونه‌های این جنس غیراسید دوست بوده و pH حدود 6/5 را ترجیح می‌دهند (Schleifer 2009) . *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از روز اول مشاهده شد و تا روز بیست و چهارم حضور داشت ولی در روز شانزدهم

www.SID.ir

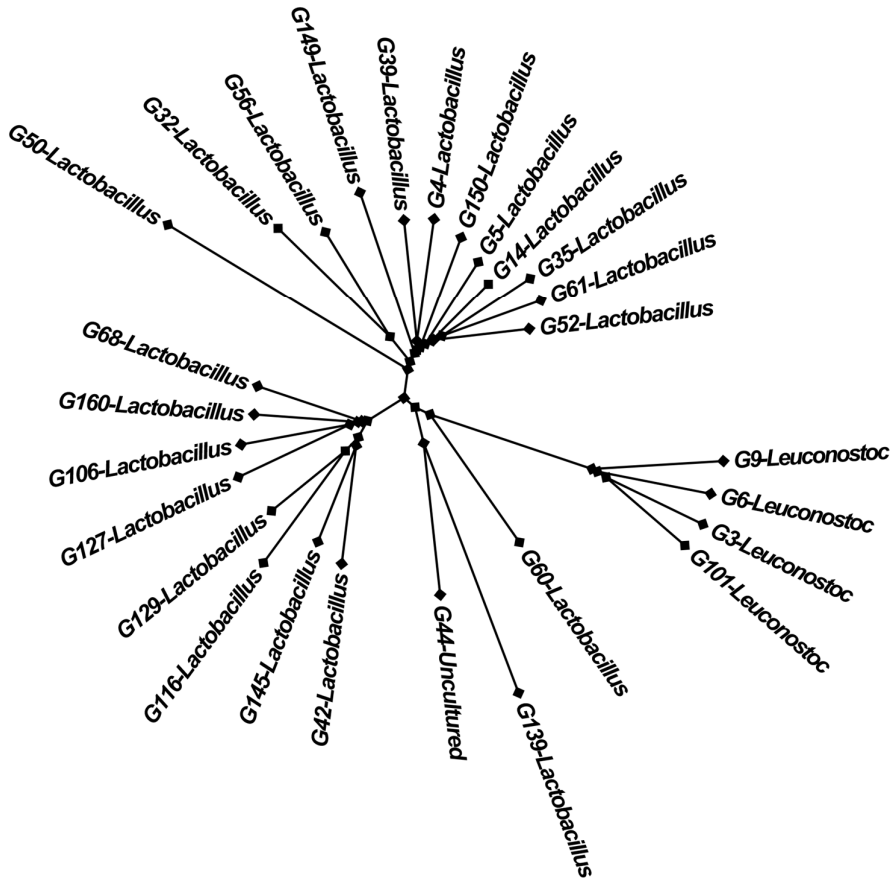
Archive of SID

باکتری غالب بود .*لاکتوباسیلوس برویس* از روز چهارم مشاهده گردید، ولی در روز سی و دوم باکتری غالب بود.

بر اساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش باکتری‌های اسید لاکتیک از جنس لاکتو باسیلوس و لوکونوستوک قبل از شروع تخمیر در فرآورده حضور داشتند. در این میان باکتری‌های هتروفرمنتاتیو نظیر لوکونوستوک غالب بوده و با تولید اسید لاکتیک، اسید استیک و دی‌اکسید کربن آغازکننده تخمیر بوده‌اند. در مراحل بعدی تخمیر و به مرور سویه‌های هوموفرمنتاتیو جایگزین سویه‌های هتروفرمنتاتیو شدند. اما در مراحل پایانی تخمیر، *لاکتوباسیلوس برویس* که باکتری هتروفرمنتاتیو اجباری می‌باشد به خاطر افزایش اسیدیته و مقاومت بهتر آن به شرایط اسیدی این باکتری در روز سی و دوم گونه غالب را تشکیل می‌داد. *لاکتو.باسیلوس کازئی* و *پانتریس* در روز شانزدهم مشاهده گردیدند و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در روز هشتم مشاهده گردید و دیگر اثری از آنها نبود (شکل 4).

درخت فیلوژنتیکی

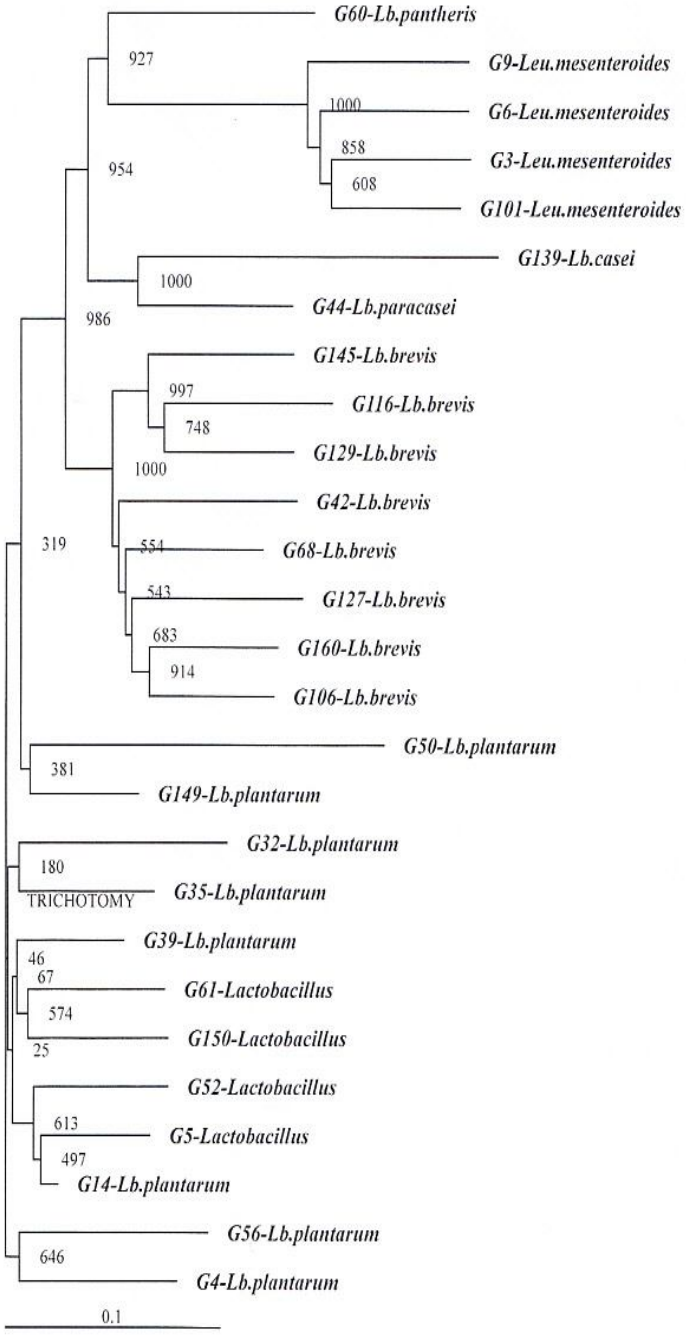
درخت (شکل 5)، موقعیت فیلوژنتیکی جدایه‌های به‌دست آمده از هویج تخمیری را نسبت به هم نشان می‌دهد. به‌طور کلی درخت رسم شده شامل سه خوشه، خوشه شماره 1، شامل سه زیرخوشه (ایزوله‌های G42, G44, G139,G101, G3,G6,G9,G60) خوشه شماره 2، شامل سه زیرخوشه (شامل ایزوله‌های G50, G32,G56,G149,G39 G52, G61, G14, G5, G150,) و در نهایت خوشه شماره 3، شامل دو زیرخوشه (شامل ایزوله‌های G129, G68, G160, G127, G106 G145, G116) بود. شکل 6، نشان می‌دهد که خوشه اول شامل سه زیرخوشه و دوجنس لوکونوستوک (گونه مزنترویدس) و لاکتوباسیلوس (گونه‌های پانتریس، کازئی و پاراکازئی) بود. خوشه دوم شامل گونه *Lactobacillus brevis* و در نهایت خوشه سوم نیز شامل گونه *Lactobacillus plantarum* بود.



شکل 5- درخت فیلوژنتیکی (نمودار ریشه‌ای)ترسیم شده براساس مقایسه توالی‌های ژن 16SrRNA متعلق به گونه‌های باکتریایی شناسایی شده از هویج تخمیری

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 6- درخت فیلوژنتیکی (نمودار قائم) ترسیم شده بر اساس مقایسه توالی‌های ژن 16S rRNA متعلق به گونه‌های باکتریایی شناسایی شده از هویج تخمیری

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از روش بیوشیمیایی و تخمیر کربوهیدرات در مقایسه با روش مولکولی نشان داد که از 26 سویه جدا شده، 9 مورد تا مرحله جنس و گونه یکسان شناسایی شدندکه از این 9 مورد، سه مورد متعلق به جنس لویکونوستوک و 6 مورد متعلق به جنس لاکتوباسیلوس است. همچنین مقایسه نتایج حاصل از این دو روش مشخص کرد که در مورد 11 ایزوله از 26 ایزوله، تا مرحله جنس یکسان شناسایی شدند و گونه آنها متفاوت شناسایی شد. اما در نهایت 6 ایزوله، جنس آنها نیز در این دو روش متفاوت شناسایی شد. این نتایج مبین این حقیقت است که نتایج حاصل از روش‌های بیوشیمیایی و تخمیر قند خیلی قابل اعتماد و موثق نبوده و حتماً باید صحت و سقم آنها با روش مولکولی سنجیده شود.

همچنین از بین 26 گونه تعیین توالی شده ایزوله شده از محصول هویج تخمیری، سویه‌های ارزشمندی همچون، *لوکونستوک مزنتروییدس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس برویس* و سویه‌های نادرتری مانند *لاکتوباسیلوس کیمچی*، *لاکتوباسیلوس پاراکفیری* در روزهای پایانی تخمیر شناسایی شدند که البته با روش مولکولی تایید نشدند. در پایان می‌توان نتیجه گرفت از آنجا که روش مولکولی به‌کار گرفته شده نیز یک روش مبتنی بر کشت بوده و استخراج DNA را از کلونی‌های رشد یافته بر روی محیط کشت، انجام می‌دهد، بنابراین انجام روش‌های مولکولی مستقل از کشت مانند DGGE، به‌عنوان مکمل این روش‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

سعیدی، م . 1392. جداسازی و شناسایی فلور لاکتیکی سالاد زمستانه(شوری) بر پایه روش های کلاسیک و مولکولی. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات 62-35.

عدالتیان، م.ر.1390. شناسایی و تعیین هویت فلور لاکتیکی پنیر های حاصل از شیر خام با استفاده از روش های مبتنی بر کشت و روش های مولکولی، رساله دکتری، دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات 76-75.

کریمی، م. 1378. چاشنی های غذایی محلی ایران، انتشارات صدف، چاپ سوم، صفحات 56-47.

یاورمنش، م. مرتضوی، ع؛ حبیبی نجفی، م.ب. 1386. پیش بینی کیفیت میکروبی شیرخام براساس مدل های ریاضی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، صفحات 55-54.

Abdi, R., Sheikh-Zeinoddin, M., Soleimanian-Zad, S. 2006. Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Iranian Lighvan Cheese. Pakistan Jornal of Biological Sciences, 9(1): 99-103.

Alegría A., Alvarez-Martín P., Sacristán N., Fernández E., Delgado S., Mayo B. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. International Journal of Food Microbiology, 136: 44-51.

Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. In: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A.(Eds.) Marcel Dekker. New York. pp 19-86.

Bamforth, W. CH.2005. Food Fermentation and Microorganisms. Blackwell publishing company London. pp 103-142.

Choi, H.J., Cheigh, C.I., Kim, S.B., Lee, J.C., Lee, D.W., Choi, S.W., Park, J.M. and Pyun, Y.R. 2002. *Weissella kimchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi.Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *52*, 507–511.

Duan, Y., Tan, Z., Wang, Y., Li, Z., Li, Z., Qin, G., Huo, Y., Cai, Y. 2008 Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Tibetan Qula cheese. Journal of General and Applied Microbiology, 54(1): 51-60.

Ebing, P., K. Rutgers. 2006. "Starter Cultures ". Preparation of Dairy Products. (Eds.) T.V.D. Haven. Netherlands, Digigrafi, 35-41.

Fitzsimons, N.A, Cogan, T.M, Condon, S, Beresford, T., 1999. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. Applied and Environmental Microbiology. 65: 3418 - 3426.

Giraffa, G., Andrighetto, C., and Antonella, C.2004. Genotyping and phenotypic divercity of lactobacillus delbrueckii. International Journal of Food Microbiology, 91: 129-139.

Grosu-tudor, S.S., and Zamfir, M.2011.Isolation and Characterization of Lactic acid bacteria from Romanian Fermented Vegetables.Romanian Biotechnological Letters. 16,148-154

Jahandideh, F., Mousavi, S.M., Razavi, S.H., 2011. Utilization of Echium amoenum extract as a growth medium for the production of organic acid by selected lactic acid bacteria. Food Bioprocess Technology. 5 (6): 2275–2279.

Kermanshahi, R.K., Peymanfar, S. 2012. Isolation and identification of lactobacilli from cheese, yoghurt and silage by 16S rDNA gene and study of bacteriocin and bio surfactant production. Jundishapur Journal of Microbiology, 5(4): 528-532.

Lampe, J.W.1999.Health effects of vegetables and fruit assessing mechanisms of action in human experimental. American Journal of Clinical Nutrition. 70:475-490.

Lee, J.S., Lee, K.C., Ahn, J.S., Mheen, T.I., Pyun, Y.R. and Park, Y.H. 2002. *Weissella koreensis* sp. nov. isolated from kimchi. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *52*, 1257–1261.

www.SID.ir

Archive of SID

Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A.,Yadav,M.,Jain,S.,Marotta,F.,Singh,V., And Yadav,h.2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. Journal of Digestive Disease.9:190-198.

Nikita, C., Hemangi, D. 2012. Isolation, Identification and characterization of lactic acid bacteria from dairy sludge sample. Journal of Environmental Research and Development. Vol, 7(1A): 234-244.

Nilay Demir, K,. Savas, B., Jale, A. 2006. The Effects of Different Initial *Lactobacillus plantarum* Concentration on Some Properties of Fermented Carrot Juice. 30:352-363.

Patil, M. M., Pal, A., Anad, T., and Ramana, K. V. 2010. Isolation and characterization Lacthc Acid Bacteria from curd and cucumber. Indian Journal of Biotechnology, 9: 166-172.

Platero, A., Maqueda, M., Valdivida, E., and Purwani, J.2009. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats milk cheeses from Sierra de Aracena. Food Microbiology, 26: 294-304.

Saeedi, M., Shahidi, F., Mortazavi, S. A., Milani, E., and Tabatabaei Yazdi, F. 2015. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria in Winter Salad (Local Pickle) during Fermentation Using 16S rRNA Gene Sequence Analysis. Journal of Food Safety. 35(3):287-294.

Salmon, C.N., Bailey-Shaw, Y.A., Hibbert, S., Green, C., Smith, A.M. and Williams, L.A., 2012. Characterisation of cultivars of Jamaican ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) by HPTLC and HPLC. Food Chemistry, 131(4): 1517-1522.

Şengül, M. 2006. Microbiological characterization ofCivil cheese, a traditional Turkish cheese: microbiological quality, isolation and identification of its indigenous Lactobacilli. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22(6): 613-618.

Schleifer, K.H.2009.phylum XIII. Firmicutes. Gibbons and Murray 1978. In: Bergy,s Manual Of Systematic bacteriology. Volume Three. (2 edition),Vos,D.F., Garrity, G.M., Jones, D.,Krieg, N.R.,Ludwig, W., Rainery, York. pp 625-634.

Tamang, B., Tamang, J. P., Schillinger, U., Franz., C. M. A. P., Groes, M., and Holzapfel, W. H. 2007. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented bamboo tender shoots of North East India. International Jornal of Food Microbiology,105: 35-40.

Tamang, J. P., Tamang, B., Schilliner, U., Franz, C. M. A. P., Groes, M., and Holzapfel, W. H. 2005.Identification of Predominant Lactic acid bacteria isolated from traditionally femented vegetable Products of the Eastern Himalayas. International Jornal of Food Microbiology, 105: 347-356.

Taheri, H. R., Moravej, H., Tabandeh, F., Zaghari, M., and Shivazad, M., 2009. Screening of Lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. Poultry Science, 88(8): 1586-1593.

Yang, G.H., Guan, J.J., Wang, J.S., Yin, H.C., Qiao, F.D. and Jia, F., 2012. Physicochemical and sensory characterization of ginger-juice yogurt during fermentation. Food Science and Biotechnology,21(6):1541–1548

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 15, No. 2, June. July. 2019, p. 323- 339

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 15، شماره 2، خرداد-تیر 1398 ص.339-323

Identification of lactic flora of fermented carrot using biochemical and molecular method and determination of their relationship with phylogenetic analysis

M. E. Goharjoo[1], M. R. Edalatian Dovom[2]*, F. Shahidi[3], F. Tabatabaei Yazdi[3], M. J. Varidi[3]

Received: 2018.03.03
Accepted: 2019.03.10

Introduction: Carrot products such as carrot juice and fermented carrot products possess high nutritional value and they are considered as a major source of β-carotene. Carotenoids because of containing conjugated double bonds, have antioxidant properties and provide the natural yellow, orange and red colors in fruits and vegetables. Due to the outbreak of some problems such as lactose-intolerance and high blood cholesterol especially in dairy products' consumption, great attention has been drawn toward fermented vegetable products. Lactic acid bacteria (LAB) including important genera: leuconostocs, lactobacilli, streptococci and pediococci are wide-spread and have been divided according to morphological features and fermentation pathway, which utilize glucose. Current knowledge regarding involved microorganisms in vegetable fermentation is still dependent on biochemical and classical data. Nowadays, application of molecular methods in the field of microbial identification has been provided better understanding from fermented foods ecology. Since local starter cultures are considered as precious genetic resources in each country and also they play an important role in production and creation of organoleptic characteristics in fermented products, therefore, the objective of present study was the isolation and identification of lactic flora from fermented carrot with the help of conventional (biochemical) and molecular methods and determination of phylogenetic relationships.

Materials and methods: Following the production of fermented carrot samples, they were packed in plastic container and stored at ambient temperatures (25-27°C). In the next step, total LAB count was performed according to Iranian standard of 5484. Isolation and selection of LAB was done during 32 days with the intervals of 0, 4, 8, 16, 24 and 32. For initial identification of LAB, isolated were subjected to gram staining and catalase tests. Also biochemical tests including growth at 15 and 45C, at NaCl 6.5% and 18%, pH=4.4 and 9.6, were done in order to identify and classify at genus level. Carbohydrate fermentation profiles were obtained for isolates with the aid of 10 sugars. Molecular identification was done with DNA extraction followed by amplification of 16S gene with universal primers (27 F and 1492 R). For sequencing of resulted PCR-products, they were sent to Macrogen Company, South Korea. Phylogenetic tree was plotted with Clustal Omega and Fig. Tree soft wares.

Results and discussion: In the first step, 144 gram positive, catalase negative isolates were screened and selected as presumptive LAB according to gram staining and catalase test and morphological characteristics. Among them, 48 representative isolates were chosen and identified up to genus level according to biochemical tests. Five distinct genera were identified as Pediococci (4.08%), homofermentative lactobacilli (34.69%), hetero fermentative lactobacilli (36.74%), Leuoconostocs (20.41%) and enterococci (4.08%). Carbohydrate fermentation profiles revealed Lactobacilli constitute the highest percent among other genera and also some species like *Lb. kimchi* and *Lb. parakefiri* were detected. Growth of lactic acid bacteria experienced increasing trend up to day-16 but thereafter showed decline trend until the end of storage time (day-32). 26 out of 48 isolates were subjected to molecular analysis. Results of sequencing revealed following species: *Lb.plantarum* (9), Lb. brevis (8), *Leu. mesenteroides* (4), *Lb. casei* (1), *Lb. paracasei* (1), and *Lb, pantheris* (1). Changes and variation of lactic flora during fermentation stages revealed that at initial stages of fermentation (0- day-8) *Leuconostocs sp*. were predominant species but disappeared then. In the next stages of fermentation *Leuconostocs sp.* were replaced by homo-fermentative strains such as *Lb. plantarum* which was present from the first day up to day-24 but constituted the majority of species on day-16. In the final stage, *Lb. brevis* dominated the others due to better survival and resistance of this bacterium at the increased acidity level. Phylogenetic tree results

1. Former MSc. Student of Food Microbiology, Food Science and Technology Department, Agriculture faculty, Ferdowsi University of Mashhad (FUM).
2. Associate Professor, Food Science and Technology Department, Agriculture faculty, Ferdowsi University of Mashhad (FUM)
3. Professor, Food Science and Technology Department, Agriculture faculty, Ferdowsi University of Mashhad (FUM).
(*Corresponding Author: edalatian@um.ac.ir)

www.SID.ir

Archive of SID

revealed three clusters including cluster I (composed of three sub-clusters), cluster II (three sub-clusters) and cluster III (two sub-clusters). Cluster I included two genera: Leuconostocs sp. (mesenteroides) and Lactobacillus (pantheris, casei and paracasei). Cluster II included *Lb. brevis* and finally cluster III composed of *Lb. plantarum*.

Keywords: Biodiversity, Lactic acid Bacteria, Carrot, Fermentation, Phylogeny.

www.SID.ir