جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در انواع ترشی و شور سنتی در تهران

محمد مهدی سلطان دلال: استاد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، بخش باکتری‌شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران.
مصطفی حسینی: استاد، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران.
ابوالفضل داودآبادی: استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران.
زهرا رجبی: کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران.
* **سحر زمانی اهری**: کارشناسی ارشد میکروب شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران (*نویسنده مسئول).
zamaniahari2011@hotmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: انواع ترشی و شور جزو محصولات سنتی تخمیری سبزیجات در ایران هستند. تاکنون تحقیقات زیادی در نقاط مختلف دنیا در مورد شناسایی تنوع باکتریایی‌های مسئول تخمیر در این گروه از مواد غذایی صورت گرفته است. نظر به انجام تحقیقات محدود در این زمینه در ایران، هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی باکتری اسیدلاکتیک (Lactic Acid Bacteria) (LAB) پایدار در انواع ترشی و شور بود.

روش کار: این پژوهش با آزمایش ۷۰ نمونه ترشی و شور سنتی که از نقاط مختلف تهران تهیه شده بود انجام گرفت. باکتری‌ها با روش کشت بر روی محیط MRS و انجام تست کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم جداسازی شدند. سپس به‌منظور شناسایی بیوشیمیایی سویه‌ها، تست‌های تخمیر قند، تولید گاز از گلوکز، هیدرولیز آرژینین و رشد در دماهای مختلف ۱۵، ۳۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

یافته‌ها: از نمونه‌های مورد آزمایش در مجموع ۱۱۴ ایزوله جداسازی شد. بعد از انجام تست‌های بیوشیمیایی، سویه‌های *L.plantarum*، *L.brevis*، *L.pentosus*، *L.casei*، *L.paracasei*، *Leu.mesenteroides* شناسایی گردید. LAB پایدار در اکثر نمونه‌ها، *L.plantarum* بود.

نتیجه‌گیری: اهمیت باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان بزرگ‌ترین گروه تشکیل‌دهنده پروبیوتیک‌ها و نیز استفاده از آن به‌عنوان یکی از هردل‌های (Hurdle) کاربردی در صنایع غذایی است. از سویی دیگر نظر به اینکه سبزیجات منبع غنی پره‌بیوتیک‌ها نیز می‌باشند، ترشی و شور می‌تواند بستر مناسبی برای تولید تنوع گسترده‌ای از محصولات فراسودمند پروبیوتیک غیر لبنی باشد. نتایج این پژوهش، بیانگر LAB پایدار جدا شده از انواع ترشی و شور سنتی تهیه شده در تهران می‌باشد که می‌تواند اطلاعات خامی را برای انتخاب گونه های پروبیوتیک برای مطالعات بعدی در جهت بهبود روند تولید صنعتی یا سنتی فراهم کند.

کلیدواژه‌ها: ترشی، شور، باکتری اسیدلاکتیک (LAB)، پروبیوتیک

مقدمه

باکتری‌های اسیدلاکتیک (Lactic Acid Bacteria) (LAB) گروه هتروژنی از باکتری‌های گرم مثبت و غیر اسپورزا هستند که بر اساس مجموعه‌ای از ویژگی‌های مورفولوژیک، متابولیک و فیزیولوژیک در یک گروه بسیار بزرگ قرار گرفته‌اند (۱). هسته مرکزی این گروه بزرگ از میکروارگانیسم‌ها، به‌طور سنتی شامل *Streptococcus*، *Aerococcus*، *Pediococcus*، *Leuconoctoc* و *Lactobacillus* می‌باشد (۲). این باکتری‌ها به‌ندرت به‌طور سطحی رشد کرده و بیشتر درون محیط‌های غنی از کربوهیدرات مانند گیاهان، مواد غذایی تخمیر شده، سطوح مخاطی پستانداران مانند دهان، روده و واژن رشد و تکثیر می‌یابند. از لحاظ احتیاجات غذایی پرتوقع هستند و اکثراً برای رشد و نمو احتیاج به محیط‌های کشت غنی شده با ویتامین‌های کمپلکس، اسیدهای آمینه و یا بعضی لیپیدها دارند. این گروه از باکتری‌ها به دلیل ویژگی‌های خاص خود دارای کاربرد بسیار زیادی در صنایع مختلف بخصوص صنعت غذا می‌باشند (۳). استفاده از LAB به‌عنوان کشت میکروبی در تولید گوشت تخمیری،

Archive of SID

www.SID.ir

لبنیات و سبزیجات تخمیری، یکی از قدیمی‌ترین شیوه‌های فرآوری مواد غذایی می‌باشد. تخمیر اسیدلاکتیکی به‌عنوان یکی از هردل‌های مهم در صنایع غذایی، علاوه بر افزایش زمان ماندگاری، باعث بهبود خواص ارگانولپتیک نیز می‌شود. موفقیت فرایند تخمیر بستگی به پرورش کشت میکروبی دارد و دقیقاً به همین دلیل است که از LAB به‌طور گسترده استفاده می‌شود. چرا که به دلیل مواد ضدمیکروبی مختلفی که تولید می‌کنند می‌توانند با طیف گسترده‌ای از میکروب‌ها که باعث مشکلات در فرایند تخمیر می‌شوند مقابله کنند. همچنین در برخی مواد مقدار ویتامین ماده غذایی تخمیر شده افزایش یافته، قابلیت هضم مواد خام نیز زیاد می‌شود (۴). از سویی دیگر، اهمیت باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان بزرگ‌ترین گروه تشکیل‌دهنده پروبیوتیک‌ها بر هیچ‌کس پوشیده نیست. در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی در کشورهای توسعه یافته در زمینه شناسایی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بومی و تولید مواد لبنی پروبیوتیک، آبمیوه‌ها، فرآورده‌های تخمیری پروبیوتیک محصولات جالیزی چون کلم، کدو، لوبیا سبز، زیتون‌پرورده انجام شده است. اگرچه هنوز محصولات لبنی به‌عنوان شناخته‌شده‌ترین مواد غذایی حامل ترکیبات پروبیوتیک مطرح هستند ولی تحقیقات زیادی نشان داده است که میوه و سبزیجات نیز می‌توانند بستر مطلوبی جهت تولید محصولات فراسودمند پروبیوتیکی فراهم کنند (۵ و ۶). در حال حاضر مطابق نظر Buckenhuskes و همکاران ادعا بر این است که محصولات گیاهی تخمیری به‌عنوان غذای آینده، به دلیل درجه بالای بهداشت و ایمنی به دلیل سرکوب رشد باکتری‌های بیماری‌زا، تولید و عرضه محصولات طبیعی و بیولوژیک، امکان غنی‌سازی محصولات با باکتری‌های اسیدلاکتیک یا اسیدهای آمینه، بهبود طعم و جلوگیری از ایجاد طعم نامطلوب ناشی از گلوکوزینولات‌ها، تولید انرژی کمتر نسبت به سایر روش‌های نگهداری مواد غذایی، روش تهیه آسان و نگهداری بدون سیستم‌های خنک‌کننده، روش آماده‌سازی آسان مواد اولیه برای تهیه انواع ترشی و شور، حائز اهمیت بالایی می‌باشند (۷). هدف از این تحقیق شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در ترشی و شور به‌منظور استفاده از آن‌ها برای بهینه‌سازی تولید صنعتی است.

روش کار

نمونه‌گیری از دی ماه ۱۳۹۲ تا فروردین ماه سال ۱۳۹۳ انجام گرفت. تعداد ۷۰ نمونه از انواع مختلف ترشی و شور سنتی شامل ترشی کلم، ترشی سیر، ترشی بادمجان، ترشی لیته، شور کلم و هویج، شور زیتون و شور خیار، از هرکدام به تعداد ۱۰ عدد، از نقاط مختلف استان تهران جمع‌آوری شده و به محل آزمایش در بخش میکروب‌شناسی مواد غذایی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال داده شد. سپس، میزان pH آب ترشی و شور با استفاده از pH متر کالیبره شده Metrohm مدل lab اندازه‌گیری شد. جهت این اندازه‌گیری، ابتدا دستگاه pH متر توسط بافرهای ۴ و ۷ تنظیم شده و سپس pH ۱۰ سی‌سی از ترشی یا شور هموژن شده مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

به‌منظور غنی‌سازی، ۵ گرم از نمونه‌های مختلف در ارلن‌های حاوی MRS ۴۵ cc براث ریخته شده و در ۳۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت در جار بی‌هوازی انکوبه گردید و بعد از رشد کلونی، نمونه‌های دارای کدورت انتخاب و به محیط MRS آگار انتقال داده شده و در ۳۵ درجه به مدت ۲ روز در جار بی‌هوازی انکوبه شد. خصوصیات اولیه کلونی باکتری‌ها نظیر قطر، رنگ، حاشیه و سطح مقایسه شد. بعد از تعیین هویت اولیه تست‌های گرم و کاتالاز انجام شد و پلیت‌های حاوی باکتری‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی انتخاب شده و تک کلنی آن به‌منظور تکثیر به محیط MRS آگار منتقل شده و در۳۵ درجه به مدت ۲ روز در جار بی‌هوازی انکوبه گردید (۸ و ۹). بعد از ۲ روز، جمعیت تکثیر شده جمع‌آوری شده و در ویال‌های حاوی MRS حاوی ۱۸٪ گلیسرول تلقیح گردیده و در ۲۰- درجه نگهداری شد. برای انجام آزمایشات بیوشیمیایی از سوش

Archive of SID
www.SID.ir

Lactobacillus plantarum PTCC 1058 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. در مرحله بعد، شناسایی گونه با انجام آزمون‌های زیر ادامه یافت: آزمون توانایی رشد در دماهای مختلف: از کلونی‌های خالص رشد کرده در محیط MRS آگار به لوله‌های حاوی MRS مایع تلقیح شده و در جار بی‌هوازی در سه انکوباتور با دماهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ درجه به مدت ۳ روز قرار داده شد (۱۰). بعد از ۳ روز در صورت بروز کدورت، نتیجه مثبت گزارش گردید.

آزمون تولید گاز از گلوکز: برای انجام این آزمون، یک محیط پایه MRS broth با کمی تغییرات، به این صورت که دی آمونیوم سیترات با آمونیوم سولفات جایگزین شد، تهیه گردید. سپس این محیط در لوله‌های حاوی دورهام تقسیم‌بندی شده و استریل گردید. سپس از کلونی‌های خالص رشد کرده بر روی آگار در این محیط تلقیح شده و به مدت ۳ روز در جار بی‌هوازی در انکوباتور ۳۵ درجه قرار داده شد (۱۰). در صورت تولید و مشاهده گاز CO_2 ناشی از تخمیر گلوکز، نتیجه مثبت گزارش شد.

آزمون تخمیر کربوهیدرات‌ها: از ۱۳ نمونه قند طبق جدول ۱ استفاده شد. برای انجام این آزمون، مطابق روش Jayne-William، ابتدا قندهای مورد نظر با غلظت ٪۲۰ و ٪۱۰ تهیه شده و سپس با استفاده از روش فیلتراسیون استریل گردیده و به‌صورت استوک‌های قندی در ظروف استریل در یخچال ۴ درجه نگهداری شد (۱۱).

سپس محیط کشت پایه یعنی MRS broth بدون گلوکز و beef extract با غلظت کلروفنل رد ٪۰/۰۰۴ تهیه گردید. سپس pH این محیط روی ۸ تنظیم شده و استریل گردید. در زیر هود با استفاده از سرم فیزیولوژی و لوله استریل، سوسپانسیون غلیظ میکروبی از کلونی های خالص تهیه گردید. بعد قندهای استوک و محیط کشت پایه در لوله‌های استریل برای تولید محیط کشت با غلظت نهایی قند ٪۰/۵ مخلوط شده و در میکروپلیت ریخته شد. بعد حدود ۱۰۸ از سوسپانسیون میکروبی در ردیف های میکروپلیت ریخته و در نهایت، جهت ایجاد شرایط بی هوازی، از پارافین استریل روی محیط ها استفاده گردید و در نهایت، در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز انکوبه شد. بعد از این مدت، در صورت تغییر رنگ محیط از قرمز به زرد نتیجه تست تخمیر قند مثبت گزارش شد (۱۲ و ۱۳).

جدول ۱- توزیع قندهای مورد استفاده در آزمون تخمیر کربو هیدرات‌ها

منوساکاریدهای شش کربنه	گالاکتوز، فروکتوز، مانوز
منو ساکاریدهای پنج کربنه	آرابینوز، گزیلوز، ریبوز
دی ساکاریدها	ساکاروز، لاکتوز، مالتوز ، سلوبیوز، ملبیوز
تری ساکاریدها	رافینوز
پلی ساکاریدهای الکلی	سوربیتول

آزمون هیدرولیز آرژینین: برای انجام این آزمون، یک محیط پایه MRS broth بدون Beef extract و دارای ٪۰/۳ آرژینین و ٪۰/۲ سیترات آمونیوم تهیه شد. سپس از کلونی‌های رشد کرده در این محیط پایه تلقیح شده و به مدت ۳ روز در جار بی هوازی در انکوباتور ۳۵ درجه قرار داده شد. بعد از ۳ روز با استفاده از معرف نسلر (K2HgI4)، آزمون ادامه یافت. در لحظه ریختن معرف نسلر در داخل محیط کشت، در صورت تشکیل رسوب نارنجی رنگ، نتیجه آزمون، مثبت گزارش شد.

نتایج حاصل از مطالعه به کمک نرم افزار SPSS ویرایش ۱۹ مورد (SPSS Inc، II، Chicago، USA) تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

ترکیبات تشکیل‌دهنده اصلی و مشترک نمونه‌های ترشی و شور خریداری شده در جدول ۲ آمده است.

در مرحله اول غنی‌سازی در محیط MRS

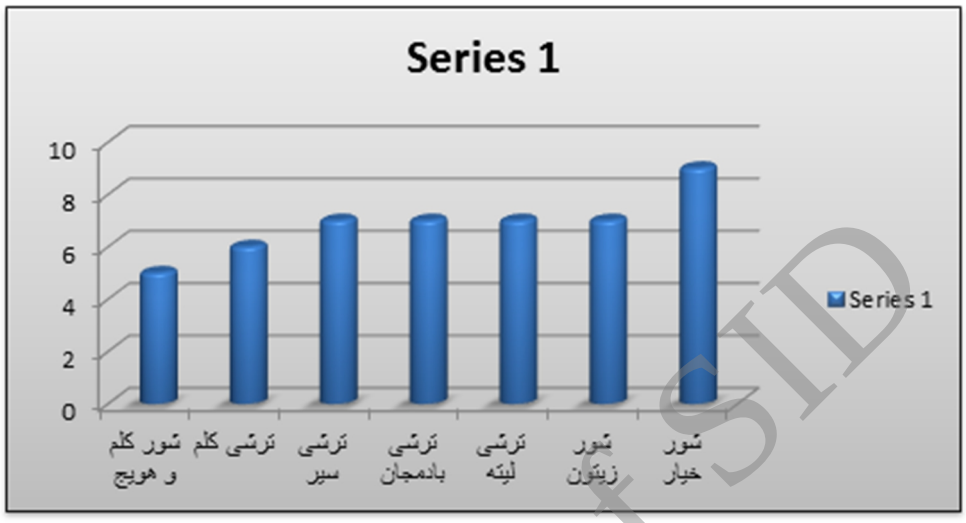
جدول ۲- توزیع ترکیبات نمونه های ترشی و شور

شماره نمونه	نام نمونه	اجزای مشترک
۱ الی ۱۰	ترشی کلم	گل کلم- خیار-هویج-کرفس-سیر
۱۱ الی ۲۰	ترشی سیر	سیر
۲۱ الی ۳۰	ترشی بادمجان	بادمجان- سبزیجات معطر
۳۱ الی ۴۰	ترشی لیته	بادمجان-کلم برگ-سیر-فلفل
۴۱ الی ۵۰	شور کلم و هویج	گل کلم- هویج
۵۱ الی ۶۰	شور خیار	خیار- سیر- فلفل- سبزیجات معطر
۶۱ الی ۷۰	شور زیتون	زیتون

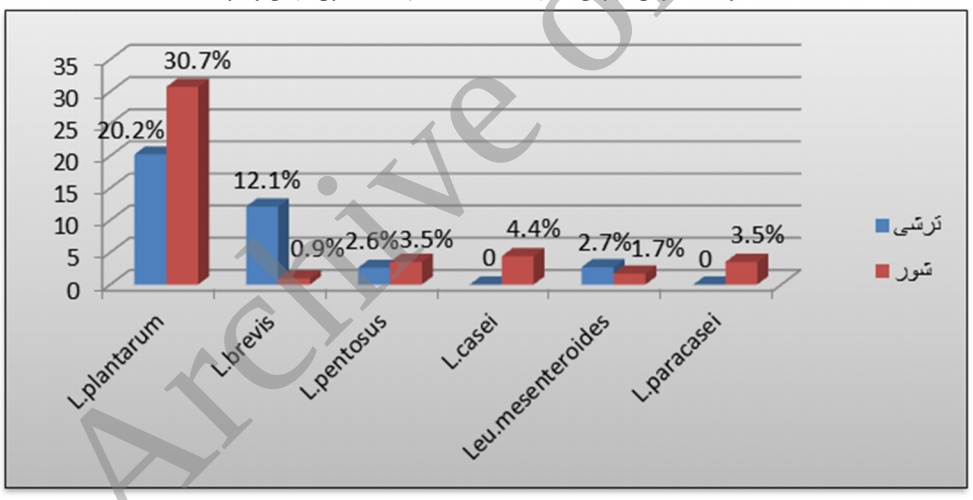
Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳- توزیع فراوانی LAB پایدار در ترشی و شور

محصول	تعدادکل	تعداد موارد مثبت از نظر وجود LAB	درصد
ترشی	۴۰	۲۷	۶۷/۵٪
شور	۳۰	۲۱	۷۰٪
انواع ترشی وشور	۷۰	۴۸	۶۸/۶٪



نمودار ۱- توزیع فراوانی باکتری اسید لاکتیک پایدار در انواع ترشی و شور



نمودار ۲- توزیع گونه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک بین ترشی و شور

broth، از هر ۱۰ نمونه مختلف ترشی کلم، ترشی سیر، ترشی بادمجان، ترشی لیته، شور کلم و هویج، شور زیتون و شور خیار، به ترتیب ۶، ۷، ۷، ۷، ۵، ۷ و ۹ نمونه دارای کدورت بوده و برای ادامه آزمون جداسازی شده و بر روی محیط MRS agar کشت داده شدند. موارد مثبت باکتری اسیدلاکتیک یا LAB در جدول ۳ نشان داده شده است.

همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، فراوانی باکتری‌های اسیدلاکتیک در شور کلم و هویج ۵ جدایه (۵۰٪)، شور زیتون، ترشی سیر، بادمجان، لیته هریک ۷ جدایه (۷۰٪)، ترشی کلم۶ جدایه (۶۰٪) و شور خیار ۹ جدایه (۹۰٪) بود. میانگین pH انواع شور، ۴ و میانگین pH انواع ترشی، ۳/۸۶ ارزیابی شد.

مجموعاً ۱۱۴ سویه LAB از ۷۰ نمونه ترشی و شور جدا شد. آزمون‌های بیوشیمیایی بر روی سویه‌های ذخیره شده انجام گرفت و بعد از مقایسه

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج با مشخصات ذکر شده در کتاب برجی (۲)، ۵ گروه به ترتیب لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۵۸)، لاکتوباسیلوس برویس (۱۵)، لاکتوباسیلوس پنتوسوس (۷)، لاکتوباسیلوس کازئی (۵) و لوکونوستوک مزنتروئیدس (۵) و لاکتوباسیلوس پاراکازئی (۴) شناسایی شد و حدود ٪۱۷ سویه‌ها به دلیل عدم تطابق مشخصات بیوشیمیایی با جداول مربوطه به‌صورت ناشناخته باقی ماندند. ٪۳۴/۵ سویه‌های ل.پلانتاروم قادر به رشد در دمای ۱۵ و ۴۵ درجه بودند، در حالی که ٪۶۵/۵ آن‌ها فقط در ۱۵ درجه قادر به رشد بودند.

بحث و نتیجه‌گیری

انواع ترشی و شور از چاشنی های پرمصرف و محبوب در منطقه خاورمیانه و بخصوص ایران محسوب می شوند که به دو روش سنتی در سطح کارگاه های کوچک و یا منازل شخصی و صنعتی در سطح کارخانه تولید و عرضه می‌شود. انواع مختلفی از محصولات تخمیری میوه و سبزی در سراسر دنیا تولید می‌شود نظیر Miso، Soya sauce، Kimchi، Tursu و انواع مختلفی از ترشی و شورهای محلی دیگر؛ اما به دلایل مختلف، همانند سایر محصولات تخمیری حاصل از لبنیات یا گوشت دارای رشد اقتصادی زیادی نمی‌باشند که علت اصلی آن‌هم مربوط به عدم وجود پروتکول‌های استاندارد تهیه و تولید و نیز وابستگی تولید آن به آب و هوای منطقه‌ای و برداشت محصول می‌شود (۱۴). اگرچه ثابت شده است که LABمیکروارگانیسم اصلی مسئول فرآیند تخمیر در سبزیجات تخمیری هست ولیLAB بومی در هر منطقه با توجه به نوع سبزیجات، منطقه جغرافیایی، دما، شرایط برداشت محصول و روش تهیه متفاوت می‌باشد (۱۵). به‌عنوان مثال، طباطبایی یزدی و همکاران در سال ۲۰۱۳، جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در غذای تخمیری Kimchi را با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت و مقایسه آن با Kimchi تخمیری کشور کره جنوبی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش نشان دادLAB شناسایی شده در Kimchi ایران و کره جنوبی از نظر جنس و گونه متفاوت است که علت آن را مربوط به مواد اولیه و سبزیجات محلی مورد استفاده و نیز شرایط تهیه دانستند (۱۶). لذا اخیراً، نظر به افزایش اهمیت تولید محصولات فراسودمند غیر لبنی، مطالعات زیادی در مناطق مختلف جغرافیایی، در جهت تعیین هویت باکتری‌های اسیدلاکتیک بومی موجود در این محصولات در حال انجام می‌باشد.

در این مطالعه نیز، سعی بر آن شد با استفاده از روش های جدید جداسازی، شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری های اسیدلاکتیک، هفتاد نمونه از انواع ترشی و شور سنتی عرضه شده در مراکز خرید تهران مورد بررسی قرار گرفته و LAB پایدار موجود در این محصولات جداسازی گردد. در منابع مختلف، برای جداسازی این باکتری ها از محیط کشت MRS استفاده شده و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ الی ۷۲ ساعت گزارش شده بود (۲۰-۱۷). در این تحقیق نیز با استفاده از محیط کشت مذکور، کلنی‌های باکتری اسیدلاکتیک ایزوله و ذخیره سازی گردید. بعد از جداسازی از روش های متداول بیوشیمیایی برای شناسایی کلنی‌ها استفاده شد. در منابع مختلف از روش‌های متعددی برای شناسایی گونه‌های باکتری اسیدلاکتیک و گونه‌های پروبیوتیک استفاده شده است که در این تحقیق نیز از تست‌های تخمیر قند، تولید گاز از گلوکز، تست هیدرولیز آرژینین و تست رشد در دماهای مختلف برای شناسایی گونه باکتری اسیدلاکتیک و از تست‌های مقاومت در برابر اسید و نمک‌های صفراوی برای شناسایی گونه پروبیوتیک استفاده گردید.

در مورد قندها، بین منابع مختلف از نظر تعداد و نوع قندها تفاوت هایی وجود دارد مثلاً برخی مانند چاماس از کیت API استفاده نموده (۱۸) و برخی دیگر بدون کیت تخمیر قندها را مورد بررسی قرار داده‌اند (۱۹، ۲۱، ۲۲). Fitzsimons در سال ۱۹۹۹، برای شناسایی، تنها تخمیر هشت قند گلوکز، رامنوز، سلوبیوز، ملیبیوز، مانیتول، ریبوز، رافینوز و مانوز را آزمایش کرد (۲۳). Ayhan و همکاران در سال ۲۰۰۵، تخمیر پنج قند اینولین، سالیسین، سوربیتول، مانیتول و لاکتوز را بررسی

Archive of SID
www.SID.ir

نمود (۲۱). Pourahmad و Assadi در سال ۲۰۰۷ نیز تنها تخمیر هشت قند گلوکز، گالاکتوز، لاکتوز، ساکاروز، مالتوز، مانوز، تره هالوز و مانیتول را بررسی کرد (۱۹). در بهترین گزارش‌ها، Scheirlinck و Vandamme در سال ۲۰۰۷ تخمیر ۱۹ قند آمیگدالین، آربوتین، گالاکتوز، سلوبیوز، لاکتوز، مانیتول، ساکاروز، ملزیتوز، ملیبیوز، رافینوز، رامنوز، سوربیتول، تره هالوز، مالتوز، ریبوز، جنتیبیوز و تاگاتوز را آزمون کرد (۲۲). Jie Yu و همکاران در سال ۲۰۱۲، تخمیر ۱۹ قند آرابینوز، سلوبیوز، اسکولین، گالاکتوز، گلوکونات، لاکتوز، مانیتول، مانوز، ملزیتوز، ملیبیوز، رافینوز، رامنوز، ریبوز، سالیسین، سوربیتول، سوربوز، ساکاروز، ترهالوز و گزیلوز را مورد بررسی قرار داد (۲۰). در این تحقیق نیز از تخمیر ۱۳ قند آرابینوز، فروکتوز، گالاکتوز، لاکتوز، مالتوز، مانوز، ملیبیوز، رافینوز، ریبوز، ساکاروز، سلوبیوز، سوربیتول و گزیلوز استفاده شد.

از میان ۱۱۴ ایزوله، حدود ٪۱۷ جدایه‌ها به دلیل عدم تطابق ویژگی های بیوشیمیایی با جداول مندرج در کتاب برجی به صورت نامشخص باقی ماندند. اختلاف این باکتری ها در مصرف قند و عدم انطباق با جداول ارائه شده ممکن است ناشی از جهش در یک یا تعدادی از ژن های مربوط به آنزیم های حد واسط در تخمیر قندها باشد. شاید در طول تکامل و با توجه به شرایط محیطی این باکتری نیاز به تخمیر این قند نداشته است، بنابراین ژن مربوط به آن دچار جهش یا حذف شده باشد (۲۴). با مقایسه نتایج شناسایی بیوشیمیایی باکتری های ایزوله شده با جداول مندرج در کتاب برجی (۲)، سویه‌های *L.plantarum*، *L.brevis*، *L.pentosus*، *L. casei*، *L.paracasei* و *Leu.mesenteroides* شناسایی شدند و اغلب این سویه‌ها (٪۵۰/۹) متعلق به *L.plantarum* بود و به مقادیر بسیار کمتر از سایر گونه‌ها نظیر *L.brevis* (٪۱۳)، *L.pentosus* (٪۶۱)، *L.casei* و *Leu.mesenteroides* (به میزان برابر ٪۴/۴) و *L.paracasei* (٪۳/۵) شناسایی شد. Jie Yu و همکاران در گزارشی که در سال ۲۰۱۲ منتشر کردند ۳۶ نمونه از ترشی سبزیجات را که از شش منطقه مختلف استان Sichuanچین جمع‌آوری شده بود بررسی کردند و ۱۸۵ سویه را جداسازی کردند که از بین آن ها ۸۱ سویه متعلق به *L.plantarum*، ۳۸ سویه *L.pentosus*، ۲۴ سویه *L.brevis*، ۱۶ سویه *L.alimentarius*، ۹ سویه *L. paracasei*، ۸ سویه *L.sakei*، ۵ سویه *P.ethanolidurans*، ۲ سویه Enterococcus thailandicus، ۱ سویه L. *spicheri* و ۱ سویه *Leuconostoc lactis* بود. در این تحقیق ل. پلانتاروم بیشترین سهم LAB پایدار را به خود اختصاص داده است (٪۴۳/۸) که با نتیجه مطالعه حاضر (٪۵۰/۹) مشابهت دارد (۲۰). در کیمچی نیز که یک نوع ترشی محلی تشکیل شده از نوعی کلم محلی (Baechu) و فلفل قرمز در کره جنوبی می‌باشد، *Leu.mesenteroides* و *L.plantarum* به‌عنوان غالب LAB تشکیل‌دهنده شناخته شدند (۲۵)، که در مورد ل.پلانتاروم با نتیجه این تحقیق همخوانی دارد ولی در مورد *Leu.mesenteroides* مشابهتی بین نتایج وجود ندارد و علت آن احتمالاً مربوط به تفاوت pH بین این دو محصول می‌شود. pH کیمچی در مطالعه‌ای که توسط Choi SY و همکاران انجام شده بود در حدود ۴/۷-۴/۴ اندازه‌گیری شد (۲۶)، در حالی که میانگین pH در مطالعه حاضر برای انواع ترشی ۳/۸۵، برای انواع شور ۴ و به طور میانگین برای انواع ترشی و شور ۳/۹۲ اندازه‌گیری شد لذا با توجه به مقاومت کمتر *Leu.mesenteroides* در برابر اسید در مقایسه با *L.plantarum* (۲۷)، این نتیجه منطقی به نظر می رسد. همچنین، Tamang و همکاران با انجام مطالعه ای بر روی سبزیجات تخمیری در هند با روش‌های فنوتیپی و RAPD-PCR نشان دادند که LABپایدار در این محصولات شامل *L.brevis*، *L.plantarum*، *P.pentosaceus*، *P.acidilactici* و *Leu. Fallax* می‌باشد که در مورد *L.plantarum* با مطالعه حاضر دارای نقطه اشتراک است (۲۸). Park و همکاران در سال ۲۰۰۹ با انجام تحقیقی برای شناسایی تنوع LAB موجود در انواع ترشی با روش غیر وابسته به محیط کشت (Culture-independent methods)

Archive of SID
www.SID.ir

نشان دادند که وجود انواع مختلفی از باکتری‌های اسیدلاکتیک نظیر *L.brevis*، *Leu.mesenteroides*، *P.pentosaceus* و *L.plantarum* بستگی به فرآیندهای پیچیده و متفاوت تخمیر در انواع ترشی دارد (۲۹)، لذا تنوع LAB در مناطق مختلف جغرافیایی، منطقی می‌باشد Yan و همکاران با انجام مطالعه ای در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که *L.plantarum* (۴۳/۶٪)، *L.pentosus* (۱۹/۱٪) *Leu.mesenteroides* (۱۱٪) و *L.brevis* (۷/۳٪) گونه‌های پایدار در ترشی‌های محلی چین هستند (۳۰) که در مطالعه حاضر نیز ل.پلانتاروم (۵۰/۹٪) و ل.برویس (۱۳٪) بیشترین آمار LAB را به خود اختصاص دادند.در این تحقیق، تمامی جدایه‌های ل.پلانتاروم در ۱۵ درجه رشد کردند و ۳۴/۵٪ آن‌ها در ۴۵ درجه نیز رشد داشتند که در مورد دمای رشد با جدول برجی همخوانی نداشت ولی در برخی مطالعات و منابع نیز به توانایی رشد ل.پلانتاروم در ۴۵ درجه اشاره شده است. برای مثال، بهرامی و همکاران در مطالعه‌ای بر روی خمیر ترش سنتی، ویژگی‌های بیوشیمیایی، تولید اسید و خواص پروبیوتیکی سه لاکتوباسیل پلانتاروم، کوروانوس و پارالیمنتاریوس را بررسی کردند. هر سه سویه در ۱۵ درجه رشد کردند و ل.پلانتاروم در دمای ۴۵ درجه نیز رشد کرد (۳۱). در این تحقیق، برخلاف بسیاری از مطالعات انجام شده بر روی انواع سبزیجات تخمیری (۳۳, ۳۲) که گونه های مختلف لوکونوستوک را جداسازی کرده بودند، فقط یک گونه *Leu.mesenteroides* و آن‌هم به میزان ۴/۴٪ از برخی نمونه‌ها جداسازی شد که دلیل این امر می تواند مربوط به مراحل مختلف فرآیند تخمیر باشد. در مطالعه‌ای که توسط Plengvidhya و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۳۴) و نیز Tao Ziong و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۲۷) بر روی Sauerkraut (یک نوع محصول تخمیری سبزیجات که ترکیب اصلی تشکیل‌دهنده آن کلم است)، انجام شد، نشان داده شد که برخی گونه‌های LAB نظیر *Leu.mesenteroides* و *Leu.lactis* در ابتدای فرآیند تخمیر رشد بیشتری داشته و سریع‌تر تولید دی اکسید کربن و اسیدلاکتیک می کنند که همراه با فعالیت سایر LAB، باعث کاهش سریع pH می‌شود که در نهایت به دلیل تحمل کمتر گونه‌های لوکونوستوک در برابر شرایط اسیدی، توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک مقاوم‌تر در برابر محیط اسیدی نظیر ل.پلانتاروم و ل.کازئی جایگزین می‌شود .

در این مطالعه، تنوع LAB در مقایسه با تحقیقات انجام شده در این مورد در کشورهای مختلف که از یک تا هجده گونه مختلف LAB را جداسازی کرده‌اند (۳۵ و ۳۶)کم به نظر می‌آید. این تنوع اندک می تواند دلایل مختلفی نظیر نوع سبزیجات و میوه جات، نوع سرکه مصرفی (سنتی یا صنعتی)، روش تهیه، درصد نمک و سرکه، دما، روش عرضه، منطقه جغرافیایی و یا شرایط و روش‌های انجام مطالعه داشته باشد Chao .و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که ترکیب خردل تخمیری بستگی به منطقه‌ای دارد که برداشت محصول از آنجا صورت گرفته است (۳۶). دمای تهیه و نگهداری و درصد نمک می‌تواند باعث تغییر تنوع LAB در انواع ترشی شود (۳۷).

با توجه به گسترش مصرف انواع مواد افزودنی شیمیایی مضر برای سلامتی در صنعت غذا، داشتن انواعی از افزودنی‌ها که ضمن حفظ ویژگی های مطلوب فاقد تبعات سوء بهداشتی باشند، سال هاست توجه همه پژوهشگران را به خود معطوف داشته است. باکتری‌های اسیدلاکتیک را می توان یکی از گزینه های مطلوب برای نیل به این هدف مورد توجه قرار داد، چرا که علاوه بر تأثیرات مطلوب روی سلامتی می تواند با ایفای نقش نگهدارنده باعث افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی گردد. یکی از نمونه های بارز این امر، نگهداری میوه و سبزی با روش تخمیر لاکتیکی (ترشی و شور) می‌باشد. از سویی دیگر، با توجه به اینکه تحقیقات نشان داده است عوامل مختلفی نظیر نوع مواد اولیه، روش تولید، آداب و سنن غذایی، منطقه جغرافیایی و ... بر تنوع باکتریایی این گروه از محصولات تخمیری مؤثر است، این تحقیق نخستین گام را برای شناسایی سویه های بومی موجود در این محصول پرمصرف برداشت. امید است با انجام تحقیقات بیشتر و

Archive of SID
www.SID.ir

بهینه‌سازی روش تولید سنتی و صنعتی، این ماده غذایی را به عنوان یک مکمل غذایی فراسودمند در راستای بهبود و ارتقای وضعیت تغذیه جامعه توصیه کرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتیجه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۲۴۰۵۱ مورخ ۹۳/۸/۱۶ می‌باشد. نویسندگان مقاله بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه جهت تقبل هزینه های طرح، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Salminen S, Von Wright A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. CRC Press. 2004; 139.

2. Whitman WB, Parte AC. Systematic bacteriology. Springer; 2009.p.464-533.

3. Aureli P, Capurso L, Casstellazi AM, Clerici M, Giovannini M, Morelli L et al. Probiotics and health: an evidence-based review. Pharmacological research; 2011. 63(5): 366-376.

4. Florou-Paneri P, Christaki E, Bonos E. Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. Lactic acid bacteria–R&D for food, health and livestock purposes. Intech, Rijeka, Croatia; 2013: 589-614.

5. Granato D, Branco GF, Nazzaro F, Cruz AG, Faria JAF. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety; 2010. 9(3): 292-302.

6. Peres CM, Peres C, Mendosa AH, Malcata FX. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria–with an emphasis on table olives. Trends Food Sci Technol; 2012. 26(1): 31-42.

7. Buckenhüskes HJ. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. FEMS Microbiol Rev; 1993. 12(1): 253-271.

8. Nelson G, George S. Comparison of media for selection and enumeration of mouse fecal flora populations. J Microbiol Methods; 1995. 22(3): 293-300.

9. Collins C, Lyne P. Microbial Methods. University Park Press, Baltimore, USA, 1970. 234: 235.

10. Kozaki M, Uchimura T, Okada S. Experimental manual of lactic acid bacteria. Asakura Syoten, Tokyo, Japan, 1992: 34-37.

11. Marroki A, Zúñiga M, Kihal M, PérezMartínez G. Characterization of Lactobacillus from Algerian goat's milk based on phenotypic, 16S rDNA sequencing and their technological properties. Braz J Microbiol; 2011. 42(1): 158-171.

12. Kandler O, Weiss N. Genus Lactobacillus Beijerinck 1901, 212AL. Bergey's manual of systematic bacteriology; 1986. 2: 1209-1234.

13. Jane-Williams D. The application of miniaturized methods for the characterization of various organisms isolated from the animal gut. J Appl Bacteriol;1976. 40(2): 189-200.

14. Çetin B. Production of probiotic mixed pickles (Tursu) and microbiological properties. African J Biotechnol; 2013. 10(66): 14926-14931.

15. Rivera-Espinoza Y, Gallardo-Navarro Y. Non-dairy probiotic products. Food Microbiol; 2010. 27(1): 1-11.

16. Tabatabaei Yazdi F, Mohebbi M, Mortazavi A, Alizadeh Behbahani B, Ghaitaranpour A, Jouki M. Isolation, identification and comparison of lactic acid bacteria from fermented be produced in Iran Kimchi with Korean commercial samples: Introduction of a probiotic product. Scien J Biol Sci; 2012. 1(6): 120-125.

17. Watanabe K, Fujimoto J, Sasamoto M, Dugersuren J, Tumursuh T, Demberel S. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in Airag and Tarag, traditional fermented milk products of Mongolia. World J Microbiol Biotechnol; 2008. 24(8): 1313-1325.

18. Chammas GI, Saliba R, Corrieu G, Beal C. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk "laban". Int J Food Microbiol; 2006. 110(1): 52-61.

19. Pourahmad R, Assadi M. Use of isolated autochthonous starter cultures in yogurt production. Inter J Dairy Technol; 2007. 60(4): 259-262.

20. Yu J, Gao W, Qing M, Sun Z, Wang W, Liu W et al. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles in Sichuan, China. J Gen Appl Microbiol; 2012. 58(3): 163-172.

21. Ayhan K, Durlu Özkaya F, Tunail N. Commercially important characteristics of Turkish origin domestic strains of Streptococcus actobacilli and Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus. Int j dairy technol; 2005. 58(3): 150-157.

22. Tamang JP, Tamang B, Schillinger U, Franz CMAP, Gores M, Holzapfel WH. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. Int J Food Microbiol; 2005. 105(3): 347-356.

Archive of SID
www.SID.ir

23. Fitzsimons N, Cogan TM, Condon S, Beresford T. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. Appl Environ Microbiol; 1999. 65(8): 3418-3426.

24. Ghobadi Dana M, Hatef Salmanian A, Yakhchali B. Isolation and identification of indigenous Lactobacilli in traditional dairy products in Iran. Res Innova food indust; 2012. 1(2):99-116.

25. Lee K, Lee Y. Effect of Lactobacillus plantarum as a starter on the food quality and microbiota of kimchi. Food Sci Biotech; 2010. 19(3): 641-646.

26. Choi SY, Beuchat LR, Perkins LM, Nakayama T. Fermentation and sensory characteristics of kimchi containing potassium chloride as a partial replacement for sodium chloride. Int J Food Microbiol; 1994. 21(4): 335-340.

27. Xiong T, Li, X, Guan Q, Peng F, Xie M. Starter culture fermentation of Chinese sauerkraut: Growth, acidification and metabolic analyses. Food Control; 2014. 41: 122-127.

28. Tamang JP, Kailasapathy K. Fermented foods and beverages of the world. CRC Press Inc. 2010.

29. Park EJ, Chang HW, Kim KH, Nam YD, Roh SW, Bae JW. Application of quantitative real-time PCR for enumeration of total bacterial, archaeal, and yeast populations in kimchi. J Microbiol; 2009. 47(6): 682-685.

30. Yan PM, Xue WT, Tan SS, Zhang H, Chang XH. Effect of inoculating lactic acid bacteria starter cultures on the nitrite concentration of fermenting Chinese paocai. Food Control; 2008. 19(1): 50-55.

31. Bahrami A, Peyghambardoost SH, Golshan Tafti A. Assessing the bile and acid tolerance and acid production of actobacilli isolated from traditional sour dough. Iranian Biosys Engen; 2014. 45(1): p. 23-30.

32. Mheen T, Kwon TW. Effect of temperature and salt concentration on kimchi fermentation. Korean J. Food Sci. Technol; 1984. 16(4): 443-449.

33. Maki M. "Lactic Acid Bacteria in Vegetable Fermentations," In: S. Salminen, A. V. Wright and A. Ouwehand, Eds., Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, Marcel Dekker, New York, 2004, 419-430.

34. Plengvidhya V, Bredit Jr F, Lu Z, Fleming HP. DNA fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations. Appl Environ Microbiol; 2007. 73(23): 7697-7702.

35. Tanasupawat S, Komagata K. Lactic acid bacteria in fermented foods in Thailand. World J Microbiol Biotechnol; 1995. 11(3): 253-256.

36. Chao SH, Wu RJ, Watanabe K, Tsai YC. Diversity of lactic acid bacteria in suan-tsai and fu-tsai, traditional fermented mustard products of Taiwan. Inter j food microbial; 2009. 135(3): 203-210.

37. Nguyen DTL, Hoorde KV, Cnockaert M, Brandt ED, Aerts M, Thanh LB et al. A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. Inter j food microbial; 2013. 163(1): 19-27.

Archive of SID

www.SID.ir

Isolation and identification of lactic acid bacteria in traditional pickles and salted pickles from Tehran, Iran

Mohammad Mahdi Soltan Dallal, Professor, Food Microbiology Research Center, Division of Food Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Mostafa Hosseini, Professor, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Abolfazl Davoodabadi, Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Babol of University of Medical Sciences, Babol, Iran.
Zahra Rajabi, Food Microbiology Research Center, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
***Sahar Zamani**, MSc of Food Microbiology, Division of Food Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author). zamaniahari2011@hotmail.com

Abstract

Background: Pickle and salted pickle are Iranian traditional fermented products. There are a lot of researches done about these groups of foods all over the world. According to few researches in this subject in Iran, the aim of this study was to isolate and identify the diversity of dominant lactic acid bacteria in pickles and salted pickles.

Methods: This research was performed by analyzing 70 samples of different pickle and salted pickles. The isolates were identified as LAB by Gram staining and Catalase by using MRS agar. Then those strains were identified at the species level by physiological tests such as NH3 production from arginine, CO2 production from glucose in MRS broth containing inverted Durham tubes, growth at temperatures of 15°C, 30°C, 45°C in MRS broth and Carbohydrate fermentation.

Results: In total, 114 presumptive LAB with Gram-positive and Catalase-negative properties were obtained from these samples. The results revealed that all isolates were identified as *L.plantarum*, *L.brevis*, *L.pentosus*, *L.casei*, *L.paracasei* and *Leu.mesenteroides*. The most predominant LAB in these pickles was *L. plantarum*.

Conclusion: The importance of LAB as an important group of probiotics and one of the most useful hurdles is clear. In other hand since vegetables are source of prebiotics, all kinds of pickles can be one of the best choices for producing different kinds of nondairy probiotic functional food products. The results indicate dominant LAB in traditional pickles and salted pickles produced in Tehran, Iran which provides raw data for further studies to improve traditional or industrial production.

Keywords: Pickle, Salted Pickle, Lactic Acid Bacteria, Probiotic

Archive of SID

www.SID.ir