Archive of SID

فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

سال اول، شماره ۲، بهار ۱۳۸۸، صفحه ۴۱ تا صفحه ۴۷

غربال انتخابی لاکتوباسیل‌های بالقوه پروبیوتیک از محصولات لبنی تخمیری محلی

مریم تاج آبادی ابراهیمی[۱]، محمد امین حجازی[۲]، پروانه جعفری[۳]

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز. **Ebrahimi_mt@yahoo.com**

۲- موسسه بیوتکنولوژی کشاورزی ABRII.

۳-کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک.

تاریخ دریافت:۸۷/۷/۱۶ تاریخ پذیرش:۸۷/۱۱/۲۲

چکیده

محصولات لبنی تخمیری اکوسیستم پیچیده‌ای ازانواع گونه‌ها و سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که جدا سازی باکتری‌های پروبیوتیک از این محصولات را با مشکل مواجه می سازند. هدف ما در این مطالعه غربال انتخابی لاکتو باسیل‌های بالقوه پروبیوتیک، از کل باکتری‌های اسید لاکتیک محصولات لبنی تخمیری محلی شامل ماست، دوغ، پنیر وکشک بدون گذراندن مراحل اولیه و زمان بر، خالص‌سازی می باشد. در این مطالعه ۳۰ نمونه مختلف از محصولات لبنی شامل ماست، دوغ، پنیر و کشک از کارگاه‌های سنتی تهیه، در دمای ٤ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه منتقل و برای غنی سازی به محیط MRS broth محیط مغذی و مناسب رشد لاکتوباسیل‌ها منتقل شدند. به منظور افزایش احتمال رشد باکتری‌های پروبیوتیک، سویه‌های حساس به شرایط اسیدی، نمونه‌های لبنی طی یک تیمار اسیدی حذف و ایزوله‌های مقاوم به اسید و املاح صفراوی روی محیط MRS agar حاوی ۱٪ املاح صفراوی جدا شدند. پس از رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز، باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت وکاتالاز منفی جنس لاکتوباسیل شناسایی و درگلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و میزان مقاومت نسبت به شرایط اسیدی و املاح صفراوی این ایزوله‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت از ۳۰ نمونه محصول لبنی مختلف، ۱۹ سویه لاکتوباسیل که بالاترین مقاومت به شرایط اسیدی و املاح صفراوی داشتند، به عنوان سویه‌های بالقوه پروبیوتیک انتخاب شدند.

کلید واژه: لاکتو باسیلوس، باکتری‌های پروبیوتیک، محصولات لبنی.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که تاثیرات مفیدی مانند بهبود سیستم ایمنی، جلوگیری از استقرار و رشد باکتری‌های بیماری زا،کاهش جذب کلسترول و کاهش احتمال ابتلا به سرطان کولون را دارند (۱). در طی انجام پژوهش‌های گذشته، اهمیت مصرف محصولات لبنی در سلامت انسان به اثبات رسیده است. امروزه بررسی‌های زیادی جهت افزودن باکتری‌های پروبیوتیک به محصولات لبنی و بررسی تاثیر این باکتری‌ها روی سلامت مصرف کننده صورت گرفته است. ازجمله مشکلات به کار گیری باکتری‌های پروبیوتیک در محصولات لبنی، عدم تحمل شرایط بوم‌شناسی محصول، از بین رفتن باکتری پروبیوتیک و هم چنین ایجاد طعم و عطر نامطلوب توسط باکتری پروبیوتیک در این محصولات است (۲). از این رو

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک از محصولات لبنی سنتی می‌تواند منجر به انتخاب باکتری‌های پروبیوتیکی با ویژگی‌هایی شود که تحمل شرایط بوم شناسی محصول لبنی را داشته و در ضمن روی عطر و طعم محصول تاثیر ناخوشایندی نگذارند، هم چنین این بررسی می‌تواند دیدگاه مناسبی جهت تولید انبوه محصولات لبنی سنتی که به طور طبیعی حاوی باکتری پروبیوتیک هستند، به ما عرضه دارد.

محصولات لبنی، اکوسیستمی پیچیده از انواع گونه‌ها و سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد (۳). این تنوع میکروبی جداسازی مستقیم باکتری پروبیوتیک از این محصولات را با مشکل مواجه ساخته است. به طوری که اغلب برای بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک از باکتری‌های ذخیره شده در کلکسیون‌های میکروبی استفاده می‌گردد (۵، ۴ و ۳). از سوی دیگر ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک وابسته به سویه می‌باشند و از دست دادن هر سویه می‌تواند منجر به از دست دادن یک باکتری پروبیوتیک با خواص ویژه شود (۶). باکتری پروبیوتیک برای رسیدن به روده و ایجاد شرایط مطلوب ملزم به عبور از pH اسیدی معده و تحمل نمک‌های صفراوی روده است (۴). از این رو اولین قدم در انتخاب باکتری پروبیوتیک ارزیابی مقاومت به اسید و صفرا است. هدف ما در این مطالعه غربال انتخابی لاکتوباسیل‌های مقاوم به اسید و صفرا از محصولات لبنی تخمیری سنتی است. در این مطالعه سعی شده با جلوگیری از رشد باکتری‌های غیر مقاوم به اسید و املاح صفراوی احتمال رشد باکتری‌های پروبیوتیک افزایش یابد. از این‌رو به طور انتخابی اقدام به جداسازی باکتری‌های بالقوه پروبیوتیک (متحمل اسید و صفرا) از محصولات لبنی سنتی شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

۳۰ نمونه مختلف از محصولات لبنی شامل ماست، دوغ، پنیر و کشک از کارگاه‌های سنتی تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد در طی ۲۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های پنیر از سه مرحله مختلف فرآوری ۰، ۲ و ۳ ماه انتخاب گردیدند.

غنی سازی

در آزمایشگاه نمونه‌ها به محیط MRS broth محیط مغذی و مناسب رشد لاکتوباسیل‌ها منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرم خانه‌گذاری شدند. جهت انحلال مناسب‌تر پنیر، ابتدا ۲۰ گرم پنیر در ۲۰ میلی لیتر سیترات سدیم ۲٪ حل و سپس به محیط MRS broth منتقل شد. دیگر نمونه‌ها به راحتی در MRS broth حل شدند.

غربال انتخابی سویه‌های مقاوم به اسید

جهت انتخاب سویه‌های مقاوم به اسید پس از مرحله غنی‌سازی محیط کشت، سانتریو فوژ (۱۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه) و میکروب‌های ته‌نشست شده درمحلول PBS اسیدی (pH=۲/۵) حل گردیدند. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، محلول به مدت ۱۵ دقیقه سانتریو فوژ (۴۰۰۰×g) و سلول‌ها از محلول جدا شدند.

غربال انتخابی سویه‌های مقاوم به املاح صفراوی

سلول‌ها به محیط MRS agar حاوی ۱٪ املاح صفراوی منتقل و ۷۲ ساعت در شرایط بی‌هوازی گرم خانه‌گذاری شدند. از باکتری‌هایی که توانایی بقاء در شرایط اسیدی و رشد در حضور ۱٪ املاح صفراوی داشتند ،کشت خالص تهیه شد.

پس از رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت وکاتالاز منفی جنس لاکتو باسیل شناسایی و در گلیسرول ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در طی مراحل خالص سازی جهت

www.SID.ir

Archive of SID

کاهش مخمرهای موجود در محیط از ۵۰ میکرو گرم نیستاتین استفاده شد (۷).

بررسی میزان تحمل اسید سویه‌های ایزوله شده

ایزوله‌های تحمل کننده اسید در محیط MRS broth در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و شرایط بی‌هوازی به مدت ۴۸ ساعت گرم خانه گذاری شدند. بعد از تهیه سریال رقت و تعیین جمعیت از هر محیط ۱ میلی لیتر به ۲۰ میلی لیتر بافر نمک فسفات (PBS) اسیدی pH=۲/۵ تلقیح و بعد از ۲ ساعت تیمار اسیدی، برای بار دوم تعیین جمعیت صورت گرفت. بر اساس جمعیت تعیین شده قبل و بعد از تیمار اسیدی، ایزوله‌ها از نظر میزان مقاومت به شرایط اسیدی گروه بندی و گروه‌های مقاوم برای بررسی بیش‌تر و آزمون‌های بعدی انتخاب شدند (۱۰، ۹ و ۸).

بررسی میزان تحمل نمک‌های صفراوی

جهت بررسی مقاومت به املاح صفراوی از oxgall که مخلوطی از cholic acid (نمک صفراوی نامحلول در آب) و taurocholicacid (نمک صفراوی محلول در آب) می‌باشد، استفاده شد. در مرحله نخست تحمل املاح صفراوی سویه‌های مقاوم به اسید انتخاب شده نسبت به غلظت ۱٪ oxgall، مشابه غلظت املاح صفراوی در مرحله اولیه ورود به روده و سپس توانایی رشد سویه‌های مقاوم در غلظت ۰/۳٪ oxgall که تقریباً برابر غلظت املاح صفراوی در روده انسان است، بررسی شد. از کشت یک شبه لاکتوباسیل‌های مقاوم به دو محیط MRS broth حاوی ۰/۳٪ املاح صفراوی و محیط MRS broth فاقد املاح صفراوی تا ۸ ساعت هر ۳۰ دقیقه یک بار تلقیح صورت گرفت، بعد از ۲۴ ساعت، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد.

نتایج

غربال انتخابی سویه‌های تحمل کننده اسید و املاح صفراوی

از میان ۳۰ نمونه محصول لبنی مورد آزمایش در مجموع ۶۹ ایزوله تحمل کننده اسید و املاح صفراوی جدا گردید. ۱۸ایزوله از پنیر ۳ ماه تولید منطقه سبلان، ۱۴ ایزوله از ماست حلبی لیقوان، ۸ ایزوله از پنیر تازه لیقوان (زمان صفر)، ۸ ایزوله از پنیر لیقوان (دو ماهه)، ۴ ایزوله از پنیر لیقوان (سه ماهه)، ۴ ایزوله از ماست تازه، ۹ ایزوله از دوغ و ۴ ایزوله از کشک جدا شد.

کد گذاری و شناسایی لاکتوباسیل‌های ایزوله شده

ایزوله‌های خالص شده از نظر واکنش گرم و تست کاتالاز مورد بررسی قرار گرفتند. باسیل‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی از جنس لاکتوباسیلوس شناسایی و بر اساس منشاء نمونه و ریخت زایی کلنی کدگذاری گردیدند (جدول ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- نتایج کدگذاری ۴۸ سویه لاکتوباسیل جدا شده

ردیف	محصول لبنی	کد	تعداد لاکتوباسیل‌های تحمل کننده اسید	تعیین جمعیت بعد از تیمار اسیدی		
				$\geq 10^{7}$	$10^{5} \geq x \geq 10^{6}$	$\leq 10^{4}$
۱	پنیرلیقوان دو ماهه	C1	۴	۲		۲
۲	پنیرلیقوان دو ماهه	C2	۳		۲	۱
۳	پنیرلیقوان سه ماهه	C3	۳			۳
۴	پنیرلیقوان سه ماهه	C4	۱	۱		
۵	پنیر سبلان	C5	۸	۳	۲	۳
۶	پنیرلیقوان تازه	C6	۸	۲	۳	۳
۷	کشک	K1	۳	۲		۱
۸	ماست	Y1	۴	۲		۲
۹	ماست خیک	Y2	۱۱	۵	۲	۴
۱۲	دوغ	D2	۱		۱	
۱۳	دوغ	D3	۲		۱	۱

بررسی میزان تحمل نمک‌های صفراوی سویه‌های مقاوم به اسید

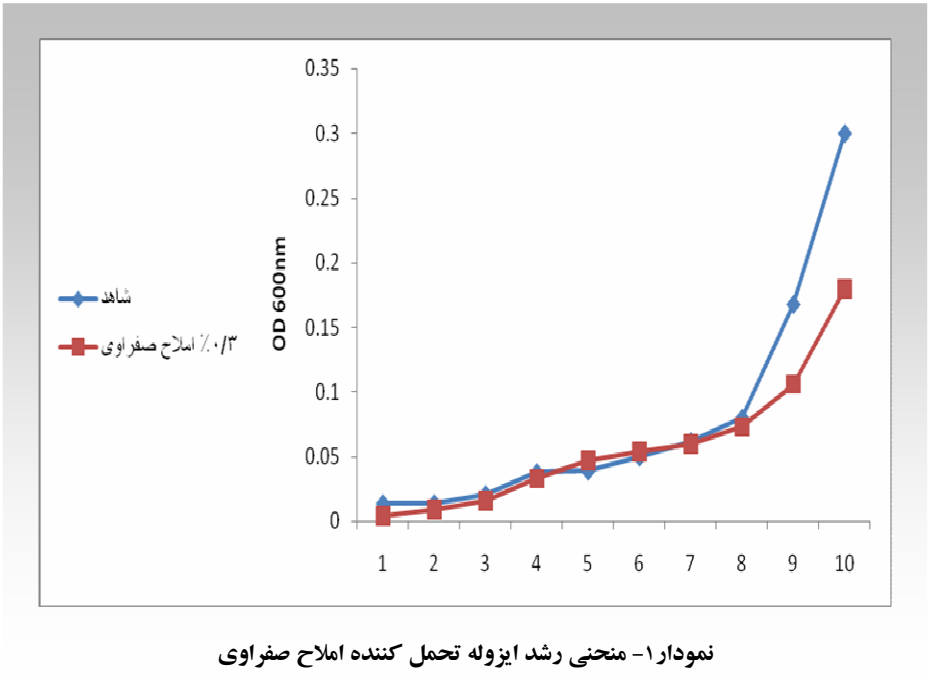
تفاوت زمانی بر اساس دقیقه بین افزایش کدورت ۰/۳ واحدی در دو محیط MRS broth حاوی ۰/۳٪ املاح صفراوی فاقد املاح صفراوی برای ۲۲ سویه مقاوم به اسید انتخاب شده از مرحله قبل، به عنوان زمان تاخیر رشد (Growth delay) تعیین شد. بر اساس زمان تاخیر رشد سویه‌ها در ۵ گروه قرار گرفتند:

- بسیار مقاوم با زمان تاخیر رشد بین ۰-۳۰ دقیقه
- مقاوم با زمان تاخیر رشد بین ۶۰-۳۰ دقیقه
- تحمل کننده با زمان تاخیر رشد بین ۹۰- ۶۰ دقیقه
- حساس با زمان تاخیر رشد بین ۱۲۰- ۹۰ دقیقه
- بسیار حساس با زمان تاخیر رشد بین ۱۸۰ -۱۲۰ دقیقه (نمودار۱ و۲).

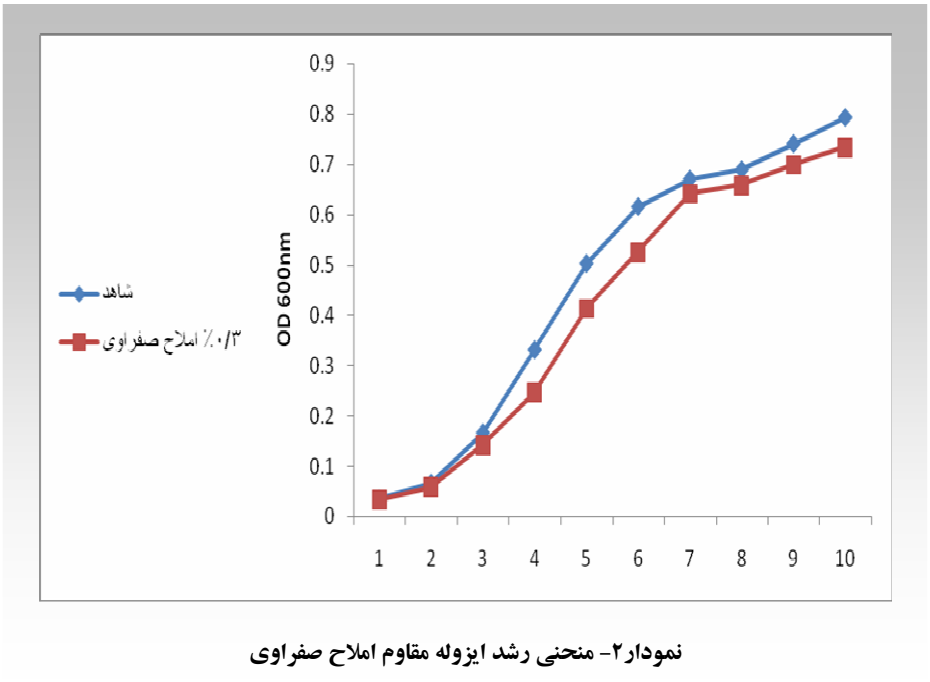
از ۲۲ سویه مورد بررسی ۷ سویه جزء گروه بسیار مقاوم، ۹ سویه جزء گروه مقاوم، ۳ سویه جزء گروه تحمل کننده، ۲ سویه جزء گروه حساس و یک سویه جزء گروه بسیار حساس به املاح صفراوی دسته‌بندی (جدول ۲) و ۱۹ سویه مقاوم و تحمل کننده نمک‌های صفراوی جهت بررسی‌های تکمیلی انتخاب شدند.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۱- منحنی رشد ایزوله تحمل کننده املاح صفراوی



نمودار۲- منحنی رشد ایزوله مقاوم املاح صفراوی

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- ارزیابی مقاومت به املاح صفرا لاکتوباسیل‌های مقاوم به اسید

شماره	کد ایزوله	منبع جداسازی	زمان تاخیر رشد (دقیقه)	مقاومت به صفرا
۱	C6m3	پنیر لیقوان تازه	۱۰	بسیار مقاوم
۲	Y1m4	ماست لیقوان	۰	بسیار مقاوم
۳	C6m1	پنیر لیقوان تازه	۳۰	بسیار مقاوم
۵	Y2l6	ماست حلبی	۳۰	بسیار مقاوم
۶	Y3f3	ماست حلبی	۱۵	بسیار مقاوم
۷	y2c4	ماست حلبی	۲۰	بسیار مقاوم
۸	C1d2	پنیر لیقوان دو ماهه	۶۰	مقاوم
۹	C5a10	پنیر سبلان سه ماهه	۶۰	مقاوم
۱۰	Y1l4	ماست	۶۰	مقاوم
۱۱	C6l2	پنیر لیقوان تازه	۴۵	مقاوم
۱۲	Y2p3	ماست حلبی	۶۰	مقاوم
۱۳	Y2b10	ماست حلبی	۴۵	مقاوم
۱۴	D3b1	دوغ لیقوان	۶۰	مقاوم
۱۵	K1l4	کشک	۶۰	مقاوم
۱۶	C2h1	پنیر لیقوان تازه	۴۵	مقاوم
۱۷	K2l3	کشک	۹۰	تحمل کننده
۱۸	C4i2	پنیر لیقوان سه ماهه	۹۰	تحمل کننده
۱۹	D2d1	دوغ	۹۰	تحمل کننده
۲۰	C5b4	پنیر سبلان سه ماهه	۱۲۰	حساس
۲۱	C5b5	پنیر سبلان سه ماهه	۱۲۰	حساس
۲۲	C6c4	پنیر لیقوان تازه	۱۸۰	بسیار حساس

بحث

فرآورده‌های لبنی دارای تنوع میکروبی بسیار غنی بوده و جداسازی تک‌تک باکتری‌ها از این محصولات بسیار وقت گیر است. به طور مثال در بررسی‌هایی که روی شیر غیر پاستوریزه و پنیر در فرانسه صورت گرفته، دو محصول ۸۸ سویه لاکتوباسیل جداسازی شده و تنها ۴ سویه از آن‌ها دارای پتانسیل پروبیوتیکی بودند (۳). در بررسی دیگر از ۱۲۲ سویه *E. faecium* جدا شده از پنیر سنتی آرژانتین ۱۱ سویه توانایی رشد در شرایط اسیدی و املاح صفراوی را دارا هستند (۱۱)، در حالی که در این بررسی با استفاده از روش غربال انتخابی از ۳۰ نمونه مختلف محصول لبنی، ۶۹ سویه لاکتوباسیل مقاوم به شرایط اسیدی و املاح صفراوی (بالقوه پروبیوتیک) جدا شد. در این بررسی اسیدی کردن محیط تا حدود زیادی سویه‌های غیر پروبیوتیکی را حذف نمود. از سوی دیگر سانتریوفوژ نمونه‌ها بعد از مرحله غنی سازی و تیمار اسیدی احتمال از دست دادن سویه‌های مقاوم به اسید را کاهش داد. از آن جا که مخمرها در شرایط اسیدی به

www.SID.ir

Archive of SID

خوبی رشد می‌کنند، تیمار اسیدی سبب افزایش رشد مخمرها و اختلال در مرحله خالص سازی شد. به طوری که کلنی‌های پهن مخمرها روی کلنی‌های ریز باکتریایی را پوشانده و جداسازی کلنی‌های تک را با مشکل مواجه می‌کرد که با افزودن نیستاتین ۵۰ میکرو بر میلی لیتر به محیط کشت، رشد مخمرها مهار گردید. باکتری‌های پروبیوتیک بعد از تحمل شرایط اسیدی روده باید نسبت به نمک‌های صفراوی روده نیز مقاوم باشند تا در سیستم گوارشی دوام بیاورند (۱۲).

نتیجه گیری

تنوع میکروبی در محصولات لبنی بسیار وسیع است. ازاین‌رو بررسی میکروفلور این فرآورده‌ها با مشکلات فراوانی همراه است. روش غربال گری مستقیم با ممانعت از رشد باکتری‌های حساس به اسید می‌تواند روشی مناسب برای جداسازی سویه‌های دارای پتانسیل پروبیوتیکی باشد و بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی محصولات لبنی را ساده‌تر سازد. در این بررسی از ۳۰ نمونه مختلف محصول لبنی تخمیری سنتی ۱۹ سویه لاکتوباسیل خالص سازی شد که نسبت به شرایط اسیدی و املاح صفراوی سیستم گوارشی مقاوم هستند. بررسی‌های تکمیلی روی این ۱۹ ایزوله مانند بررسی میزان مقاومت کاهش کلسترول وتوانایی ممانعت از رشد باکتری‌های بیماریزا می‌تواند منجر به انتخاب سویه‌های مناسب پروبیوتیک از محصولات لبنی تخمیری سنتی شود.

منابع

1. Holzapfel WH. (1998) Overview of gut flora and probiotics. International Journal of Food Microbiology. 41: 85–101.
2. Saarela M. (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnol. 84: 197–215.
3. Vale´rie C, Micheline G, Vernoux JP. (2004) In vitro screening of potential probiotic activities of selected *Lactobacilli* isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. Journal of Dairy Research. 71: 451–460.
4. Ambadoyiannis G. (2004) Probiotic and technological properties of *Enterococci* isolates from infants and cheese. Food Biotecnology. 18(3): 307–325.
5. Vijendra M, Prasad DN. (2004) Appliction invitro medthods for selection of *lactobacillus casei* strains as potential probiotics. Food Microbiology. 103: 109-115.
6. Liong MT. (2005) Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* strains. Journal of Dairy Science. 88: 55-66.
7. Gardiner G. (2004) Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. Applied and Environmental Microbiology. 70: 1885-1906.
8. Conway P L. (1987) Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. Journal of Dairy Science. 70: 1-12.
9. Gilliland SE, Walker DK. (1989) Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesteremic effect in humans. Journal of Dairy Science.73: 905-911.
10. Liong MT. (2005) Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. Journal of Dairy Science. 88: 55-66.
11. Saavedraa L. (2003) Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. International Journal of Food Microbiology. 88: 241– 245.
12. Morelli l. (2000) In vitro selection of probiotic *lactobacilli acritical* appraisal. Intestinal Microbiology. 2: 59-67.

www.SID.ir

Archive of SID

Abstract

Traditional fermentative dairy products are complex ecosystem of lactic acid bacteria and because of this microbial variety, direct isolation of probiotic from traditional dairy products is very complicated operation. Aim of this study was to selective screening of potential probiotic *lactobacilli* from traditional dairy products including yoghurt, cheese, and dried whey without passing through preliminary time consuming isolation steps. In this study, 30 different samples of diary products were prepared from traditional workshops and following the delivery to laboratory in 4^{o}C, they carried to MRS broth that is considered as a suitable nutritive medium for incubation of lactobacilli. In order to increase the possibility of probiotic bacteria growth, dairy samples went through an acidic treatment and then the species sensitive to acidic condition were omitted and the isolates which were resistant to acid and bile salts were separated on a MRS agar medium containing 1% bile salts. Following the warm coloration and catalase test, the positive warm bacilli and lactobacilli negative catalase were identified and stored under glycerol in -70^{o}C and their resistance to acidic condition and bile salts were evaluated. Finally, from among 30 different dairy samples, 19 *lactobacilli* species which had the highest resistance to acidic condition and bile salts were chosen as the potential probiotic species.

Key word: *lactobacillus*, probiotic bacteria, diary products

www.SID.ir