



10.30495/JFH.0621.669328

«مقاله پژوهشی»

مطالعه ویژگی‌های شیمیایی و میکروبی شیر خام شتر و شناسایی فلور غالب باکتری‌های لاکتیک اسید به روش PCR در شهر سمنان

مهنوش پارسایی مهر^{۱*}، حمید استاجی^۲، اشکان جلی جوان^۳، آزاده سلیمی^۱، فرشته عرب^۴، آریتا فرخی^۵، منصوره کنعانی^۶

۱. استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۲. استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۳. دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۴. مربی گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۵. دانش‌آموخته کارشناسی گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۶. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: mparsaei@semnan.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۸/۲/۳۰ پذیرش نهایی: ۹۸/۸/۲۰)

چکیده

شیر شتر یکی از منابع مهم تغذیه‌ای از نظر پروتئین، ویتامین و مواد معدنی می‌باشد که برای سلامتی مفید و حائز اهمیت است. هدف از انجام این تحقیق بررسی کیفیت میکروبی، ویژگی‌های شیمیایی و بررسی حضور باکتری‌های اسیدلاکتیک در شیر شتر می‌باشد. در این مطالعه تعداد ۲۴ نمونه شیر شتر از دامداری‌های شهر سمنان در طول یک ماه به صورت تصادفی جمع‌آوری و در شرایط سترون در کنار یخ به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی منتقل شد سپس به منظور بررسی خصوصیات شیمیایی و میکروبی مورد آنالیز قرار گرفت. میزان pH درصد پروتئین و درصد چربی به ترتیب در دامنه ۶ تا ۶/۶، ۱ تا ۳ درصد و ۲ تا ۳/۵ درصد به دست آمد. میزان متوسط تعداد کلی باکتری‌های هوازی، انتروکوکوس، میکروکوکوس، باکتری‌های اسیدلاکتیک هوازی و بی‌هوازی و کپک و مخمر به ترتیب 6.0 ± 0.8 ، 6.0 ± 0.8 ، 3.7 ± 0.7 ، 4.1 ± 0.6 ، 5.2 ± 0.4 ، 5.1 ± 0.3 ، 1.5 ± 0.8 log cfu/ml به دست آمدند. قابل ذکر است که کلی فرم و انتروباکتریاسه از هیچ یک از نمونه‌های شیر شتر جدا نشد. استافیلوکوکوس اورئوس با دامنه 2.7 ± 0.8 log cfu/ml تا 4.9 ± 0.4 جدا گردید. علاوه بر این، شناسایی جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک از طریق تعیین توالی 16s rDNA صورت گرفت. براین اساس، جدایه‌ها متعلق به لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پاستوریانوس، انتروکوکوس فسیوم و انتروکوکوس فکالیس بودند. نتایج حاصل از این مطالعه تنوع میکروبی را در شیر شتر نشان داد.

واژه‌های کلیدی: شیر شتر، خصوصیات شیمیایی، باکتری‌های لاکتیک اسید

مقدمه

(Kumari et al., 2015; Hailu et al., 2016; Khalesi et al., 2017). علاوه بر این آثار ضد میکروبی شیر شتر مقابل عوامل بیماری‌زا مانند /شیرشپای کولای (*Escherichia coli*) و /استافیلوکوکوس ائروس (*Staphylococcus aureus*) نشان داده شده است (Hassan Yassin et al., 2015). به دلیل دارا بودن مقادیر بالایی از ترکیبات ضدباکتریایی مانند لیزوزیم، لاکتوفرین، لاکتوپراکسیداز، ایمونوگلوبولین‌ها و باکتريوسین‌ها، ماندگاری طولانی تری نسبت به شیر گاو دارد (Ahmad et al., 2016). در برخی مطالعات چربی و پروتئین شیر شتر را بیشتر از شیر گاو گزارش کرده‌اند و از سوی دیگر کلسترول شیر شتر کمتر از شیر گاو بیان شده است (Faye et al., 2015; Kula et al., 2016). شیر شتر در بررسی‌ها به‌عنوان منبعی غنی از لاکتیک اسید باکتری‌ها با پتانسیل پروبیوتیکی معرفی شده است (Hawaz Khedid et al., 2009; Jans et al., 2012; Hawaz et al., 2016; Mahmoudi et al., 2016). هم‌چنین در یک مطالعه، لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از شیر تخمیرشده شتر (چال) را به‌عنوان باکتری‌هایی با خواص ضد مخمری علیه رودوترونا گلوتینیس (*Rhodotorula glutinis*) معرفی کرده‌اند که می‌توان از آن‌ها برای جلوگیری از فساد قارچی مواد غذایی به‌ویژه در دوغ استفاده کرد (Khomeiri et al., 2017). در یک بررسی، فواید سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) جدا شده از شیر شتر را در تولید پنیر کم‌چرب بسیار مناسب‌تر از انواع تجاری معرفی کرده‌اند (Al-Dhaheri et al., 2017). شیر شتر عمدتاً به‌صورت تازه، خام و یا تخمیر شده (چال) به مصرف می‌رسد (Moslehishad et al., 2013).

در دهه‌های اخیر تغییرات آب و هوایی به سمت گرم و خشک شدن کره زمین و طولانی‌تر شدن فصل گرما به‌خصوص در مناطق خشک همراه بوده است. کمبود غذا و آب بر زندگی حیوانات و گسترش آن‌ها تأثیر زیادی داشته که از این میان شتر کم‌ترین حساسیت را به این تغییرات نشان داده است (Adugna and Asresia, 2014; Gizachew et al., 2014). سازمان غذا و دارو، جمعیت شتر در جهان را حدود ۲۵ میلیون نفر تخمین زده است که حدود ۱۱٪ آن‌ها دو کوهانه و ۸۹٪ از آن‌ها یک کوهانه هستند (Sharma and Singh, 2014). شتر در شرایط محیطی دشوار نسبت به سایر حیوانات شیر بیشتری را در مدت طولانی‌تری تولید می‌کند (Khan and Iqbal, 2001). شیردهی شتر روزانه سه تا ۱۰ کیلوگرم به‌مدت ۱۲ تا ۲۸ ماه می‌باشد که یکی از ترکیبات اساسی در رژیم غذایی جوامع گله‌دار است (Gizachew et al., 2014). شیر شتر غنی از ویتامین C است. به طوری که مقدار این ویتامین به سه تا پنج برابر شیر گاو و دو برابر شیر انسان می‌رسد (Al haj and Al Khani, 2001). اهمیت این مسئله در این است که در مناطق بیابانی با دسترسی کم به سبزی و میوه، جذب این ویتامین از طریق شیر شتر مانع کمبود آن در انسان است. شیر شتر منبع مهم پروتئین برای مردمان مناطق خشک جهان است و میزان اسیدآمینه‌های ضروری آن نسبت به شیر گاو بیشتر است (Saliha et al., 2013). هم‌چنین به دلیل شباهت شیر شتر به شیر انسان و خواص ضدآلرژی، ضددیابتی و ضدسرطانی، در بسیاری از مناطق جهان به‌منظور درمانی به‌کار می‌رود.

Ahmed and Kanwal, 2004; Edalatian *et al.*,)
(2012).

هدف از این مطالعه آنالیز برخی از خصوصیات میکروبی و شیمیایی شیر خام شترهای منطقه سمنان و همچنین شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک غالب این شیر با استفاده از تعیین توالی 16s rRNA می‌باشد. در نتیجه تعیین سلامت و ارزش غذایی آن صورت می‌گیرد. علاوه بر آن، جداسازی سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک زمینه را برای انجام مطالعات بعدی و تعیین خواص تکنولوژیک و پروبیوتیک آن‌ها فراهم می‌سازد.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌گیری

جهت انجام این مطالعه، ۲۴ شتر تک‌کوهانه حومه سمنان به صورت تصادفی انتخاب شدند. پیش از نمونه‌گیری، سه دوشش ابتدایی دور ریخته شد، سپس سطح پستان‌های دام با الکل ۷۰٪ ضدعفونی و با دستمال سترون خشک شده و بعد با دستکش سترون مبادرت به دوشش شیر به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر در ظروف سترون درب‌دار گردید. نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان منتقل و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری و در کم‌تر از ۱۲ ساعت، آزمایشات موردنظر بر روی آن‌ها صورت گرفت.

- آزمون‌های شیمیایی

ویژگی‌های شیمیایی نمونه‌های شیر شتر مانند اسیدیته، درصد پروتئین، pH، درصد خاکستر، درصد چربی و درصد نمک طعام در سه تکرار انجام شد. مقدار پروتئین کل نمونه‌ها به روش کلدال، اسیدیته بر

و به دلیل استقبال از این شیر در مصارف درمانی به شکل حرارت ندیده، توجه بسیاری در زمینه بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و میکروبی آن معطوف شده است. مطالعات بسیاری، طیف وسیعی از مقادیر مختلف ترکیبات شیمیایی شیر شتر را گزارش کرده‌اند. تفاوت‌های موجود در میزان ترکیبات می‌تواند ناشی از سیستم پرورشی، اختلافات گونه‌ای (Aljumaah *et al.*, 2012)، وراثت، فصل، جغرافیا، سن، جیره غذایی، کیفیت و کمیت آب در دسترس، دوره شیردهی و فاصله هر بار دوشش باشد (Khaskheli *et al.*, 2005). هم‌چنین کیفیت میکروبی موجود در شیر خام می‌تواند تحت تأثیر عواملی همچون شرایط و بهداشت دوشش، ورم پستان و یا شرایط نگهداری شیر قرار گیرد (El-Ziney *et al.*, 2007).

از دیر باز باکتری‌های اسیدلاکتیک به عنوان مهم‌ترین عامل رسیدن فراورده‌های شیر، اسیدی شدن، ایجاد بافت، عطر و طعم در این فراورده‌ها شناسایی شده‌اند و باکتری‌های ذاتی هر محصول، نقش اصلی را در این زمینه بازی می‌کنند. اکثر فراورده‌های شیر تخمیری بومی هر منطقه دارای فلور میکروبی ویژه منحصر به خود می‌باشند و همین تفاوت‌ها باعث ایجاد تنوع در رایحه و طعم ویژه در فراورده‌های مختلف می‌شود. البته عوامل دیگری از جمله نوع ماده اولیه، افزودنی‌ها و هم‌چنین نحوه فرآیند نیز بر خصوصیات ویژه محصول تأثیرگذار هستند. بنابراین برای حفظ خواص سنتی و ویژگی‌های ارگانولپتیکی فراورده‌های شیر تخمیری، باید سویه‌های خاص باکتری‌های اسیدلاکتیک ذاتی فراورده‌های بومی هر منطقه جداسازی، شناسایی و گروه‌بندی شوند و قابلیت‌های عملکردی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد

سلیوس به روش کشت سطحی و با گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انجام گردیدند (Parsaeimehr *et al.*, 2015).

- شناسایی مولکولی لاکتیک‌اسید باکتری‌ها

به منظور شناسایی و جداسازی لاکتیک‌اسید باکتری‌های شیر شتر، پرگنه‌های‌های شناسایی شده در محیط MRS آگار با آنس استریل برداشته شدند و در محیط MRS Broth به کشت انبوه رسانیده شده سپس ۸۰۰ میکرولیتر از کشت باکتری را با ۲۰۰ میکرولیتر گلیسرین در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری مخلوط کرده و برای انجام مراحل بعد در فریزر ۷۰- نگهداری شدند.

- استخراج اسیدهای نوکلئیک

جهت استخراج DNA از روش تجزیه قلیایی ژنوم باکتری با استفاده از سود نیم‌نرمال و تریس یک مولار مطابق دستورالعمل انجام شد. به منظور تازه‌سازی، سویه‌ها در محیط MRS آگار در دمای ۳۰ درجه سلیوس به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس از پرگنه‌های رشد یافته برداشت کرده و به میکروتیوب‌های حاوی ۲۵ میکرولیتر NaOH نیم نرمال افزوده می‌شد تا شیرابه‌ای یکنواخت به دست آید. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، ۲۵ میکرولیتر تریس (حاوی ۱۰۰ میلی مولار Tris-HCl, pH=8.0) به سوسپانسیون فوق اضافه می‌گردید تا عمل هضم باکتری‌ها توسط سود متوقف شده و محلولی با pH نهایی ۷/۵ تهیه شود. بلافاصله با افزودن ۴۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به مجموعه حجم محلول به ۵۰۰ میکرولیتر رسیده و رقت نهایی از عصاره DNA جهت انجام آزمون PCR تهیه گردید (Staji *et al.*, 2019).

اساس درجه درنیک به روش AOAC (۱۹۹۰) انجام گردید. مقدار چربی به روش ژربر (Rashid and Miyamoto, 2005)، میزان pH نمونه‌ها، با استفاده از pH متر (Zag Chemie Co. Germaney) و میزان خاکستر و درصد نمک طعام به روش AOAC (۱۹۹۰) اندازه‌گیری شد.

- آزمون‌های میکروبی

آزمون‌های میکروبی، شامل شمارش تعداد کلی باکتری‌های هوازی و مزوفیل با استفاده از محیط BHI agar (Merck, Germaney) در دمای ۳۷ درجه سلیوس، تعداد کلی باکتری‌های اسیدلاکتیک (هوازی) (*Lactic acid bacteria*) با استفاده از محیط MRS آگار (Biolife, Italia) و در دمای ۳۰ درجه سلیوس، تعداد کلی باکتری‌های اسیدلاکتیک (بی‌هوازی) با استفاده از محیط MRS آگار در دمای ۳۰ درجه سلیوس، تعداد کلی فرم‌ها (Coliforms) با استفاده از محیط VRBA آگار (Quelab, Canada) و در دمای ۳۷ درجه سلیوس، تعداد انتروباکتریاسه‌ها با استفاده از محیط VRBG آگار (Quelab, Canada) و در دمای ۳۷ درجه سلیوس، تعداد *استافیلوکوکوس‌ها* با استفاده از محیط برد پارکر (Quelab, Canada) و در دمای ۳۷ درجه سلیوس، تعداد انتروکوکوس‌ها (Enterococci) با استفاده از محیط کانامایسین آسکولین آژاید آگار (Quelab, Canada) و در دمای ۳۷ درجه سلیوس تعداد میکروکوکوس‌ها (*Micrococci*) با استفاده از محیط مانتول سالت آگار (Merck, Germaney) و در دمای ۳۷ درجه سلیوس و تعداد کپک و مخمر با استفاده از محیط پوتیتو دکستروز آگار (Quelab, Canada) اسیدی شده با اسید تارتاریک ۱۰٪ و در دمای ۲۵ درجه

- انجام آزمون PCR جهت شناسایی لاکتیک‌اسید باکتری‌ها

پس از انجام مراحل استخراج DNA از پرگنه‌های مورد مطالعه، به منظور تقویت ناحیه کد کننده 16s rDNA (۱۵۰۰bp) واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر و در دستگاه PCR Thermal Cycler (Bioer xp, China) صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با مرحله واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ چرخه با مرحله واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و سرانجام یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (Partoei et al., 2015). پرایمرهای یونیورسال مورد استفاده در واکنش PCR برای کل توالی ژن 16s rDNA شامل: 5'-27F=3'-AGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG و 3'-525R=AAGGAGGTGA/TTCCAA/GCC-3' جهت قرائت نتایج PCR چندگانه، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱٪/۱/۵ الکتروفورز گردید. در گوده اول ژل نیز مارکر 100bp-plus استفاده شد (شکل ۱). برای رنگ آمیزی ژل از رنگ Ethidium Bromide استفاده شده و زیر دستگاه UV illuminator (Nanolytik, UK) نتایج بررسی شد.

- تخلیص محصولات PCR

به منظور تعیین توالی محصولات PCR نیاز به تخلیص آن‌ها می‌باشد. برای تخلیص نمونه‌ها از کیت تخلیص اسیدهای نوکلئیک از ژل (Vivantis Sdn Bhd, Malaysia) طبق دستورالعمل کیت استفاده شد.

- تعیین توالی قطعات DNA

تعیین توالی محصولات PCR توسط شرکت تکاپوزیست انجام گردید.

- آزمون توالی ژن 16s rDNA

در این مرحله به جستجوی شباهت توالی ژن 16s rDNA در اطلاعات موجود در National Centre for Biotechnology Information (NCBI) homepage با استفاده از Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) اقدام شد و بر اساس نتایج، گونه جدایی‌ها مشخص گردید.

یافته‌ها

- کیفیت میکروبی

نتایج آزمون میکروبی نمونه‌های شیر شتر در جدول (۲) آورده شده است. متوسط شمارش کلی باکتری‌ها $6.0 \pm 0.6 \log \text{ cfu/ml}$ می‌باشد. متوسط تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در شرایط هوازی و بی‌هوازی به ترتیب $5.2 \pm 0.4 \log \text{ cfu/ml}$ و $5.1 \pm 0.3 \log \text{ cfu/ml}$ محاسبه گردید. همان‌طور که در جدول (۲) مشاهده می‌شود تفاوتی میان تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در شرایط هوازی و بی‌هوازی دیده نمی‌شود. کلی‌فرم و انتروباکتریاسه از هیچ‌یک از نمونه‌های شیر شتر جدا نشد. انتروکوکوس و میکروکوکوس از تمام نمونه‌های شیر به ترتیب با متوسط تعداد $3.6 \pm 0.7 \log \text{ cfu/ml}$ و $4.1 \pm 0.6 \log \text{ cfu/ml}$ جدا سازی شد. استافیلوکوکوس اورئوس با دامنه $2.7 \log \text{ cfu/ml}$ تا $4.4 \log \text{ cfu/ml}$ جدا شد. متوسط تعداد کپک و مخمر در نمونه‌های مورد مطالعه $1.1 \pm 0.8 \log \text{ cfu/ml}$ می‌باشد.

جدول (۱) - میکروارگانیسم‌های مشاهده شده در شیر شتر

log cfu/ml			
بakteri	میانگین	حداقل	حداکثر
شمارش کلی	6/08 ± 0/06	5/8	6/15
انتروکوکوس	3/66 ± 0/72	2/62	4/39
میکروکوکوس	4/14 ± 0/06	3/20	4/65
کیک و مخمر	3/84 ± 1/15	2/14	4/20
استافیلوکوکوس	3/72 ± 0/75	2/87	4/49
LAB هوازی	5/24 ± 0/42	4/8	5/7
LAB بی‌هوازی	5/18 ± 0/18/35	4/75	5/61

کیفیت شیمیایی

به‌طور میانگین 6/34 ± 0/21 می‌باشد. میانگین درصد پروتئین 1/82 ± 0/82، چربی 2/84 ± 0/59، خاکستر 1/36 ± 0/27 و نمک طعام 1/96 ± 0/21 شیر اندازه‌گیری شدند.

مطابق جدول (۲) آزمون شیمیایی ۲۴ نمونه از شیر خام شتر نشان داد که اسیدیته (درصد اسیدلاکتیک) شیر شتر به‌طور میانگین 15/8 ± 1/48 درجه دورنیک بوده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد pH نمونه‌های اخذ شده شتر در محدوده‌ای بین ۶ تا ۶/۶ متغیر بوده است و

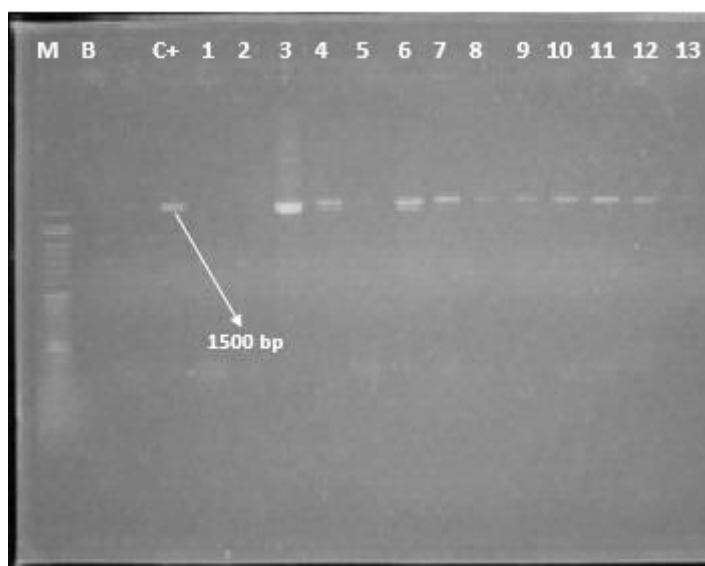
جدول (۲) - نتایج آنالیز شیمیایی نمونه‌های شیر شتر

اسیدیته (دورنیک)	pH	پروتئین (%)	چربی (%)	خاکستر (%)	نمک طعام (%)	میانگین
15/8 ± 1/48	6/34 ± 0/21	1/82 ± 0/82	2/84 ± 0/59	1/96 ± 0/21	1/36 ± 0/27	
18	6/6	3	3/5	2/2	1/7	حداکثر
14	6	1	2	1/6	1	حداقل

شناسایی جدایه‌های اسیدلاکتیک غالب

Entrococcus facium) و *انتروکوکوس فکالیس* (*Entrococcus fecalis*) می‌باشند. شکل باندهای حاصل از PCR مربوط به جدایه‌ها نیز در شکل (۱) نشان داده شده است.

آنالیز توالی ژن 16s rDNA نشان داد که جدایه‌ها متعلق به *لاکتوباسیلوس کازئی* (*Lactobacillus casei*)، *لاکتوباسیلوس پاستوریانوس* (*Lactobacillus pasturianus*)، *انتروکوکوس فسیوم* (*Entrococcus*)



شکل (۱) - محصول PCR صورت گرفته روی ژن کامل 16s rDNA (1500 bp) از جدایه‌ها که با استفاده از پرایمرهای یونیورسال (27f و 1525r) تقویت شده است. M: مارکر 50 جفت بازی، C+: شاهد مثبت. شماره‌های ۱-۱۳ جدایه‌های باکتری‌های لاکتیک/اسید مورد مطالعه. B (بلانک): شاهد منفی (مخلوط واکنش فاقد DNA الگو).

میکروارگانسیم‌ها $1/4 \log \text{cfu/ml}$ گزارش گردیده است (El-zinay *et al.*, 2007; Elemam *et al.*, 2018). این در حالی است که در مطالعه‌ای بر روی ویژگی‌های میکروبی شیر خام شترهای ناحیه موروکان، میزان کل کلی‌فرم‌ها $6/84 \log \text{cfu/ml}$ گزارش شده است (Benkerroum *et al.*, 2003). این تفاوت‌ها نشان می‌دهند که باکتری‌های کلی‌فرمی همیشه در نمونه‌های آنالیز شده حضور ندارند و این موضوع از حساسیت این دسته باکتریایی به سیستم ضد میکروبی شیر شتر در مقایسه با سایر باکتری‌ها ناشی می‌شود (Enanni *et al.*, 2004). میانگین حضور میکروارگانسیم‌های انتروکوکوس و میکروکوکوس در مطالعه حاضر به ترتیب $3/66 \pm 0/72 \log \text{cfu/ml}$ و $4/14 \pm 0/06 \log \text{cfu/ml}$ محاسبه گردید. حضور انتروکوکوس در مطالعه‌ای در

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه خصوصیات میکروبی شیر خام شترهای منطقه سمنان مورد مطالعه قرار گرفت. متوسط تعداد کل باکتری‌های هوازی و مزوفیل در شیر خام شتر $6/08 \pm 0/06 \log \text{cfu/ml}$ بوده در حالی که متوسط تعداد کل باکتری‌ها در شیر خام شتر منطقه جنوبی امارات متحده عربی $5/41 \log \text{cfu/ml}$ گزارش گردید (Omer and Eltinay, 2008). یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که از میان ۲۴ نمونه شیر خام هیچ‌کدام دارای جمعیت کلی‌فرمی نبودند که در مطالعه بر روی شیر شتر منطقه جنوبی امارات، جمعیت کلی‌فرم‌ها را $1/83 \log \text{cfu/ml}$ اعلان کردند (Omer and Eltinay, 2008). هم‌چنین در نمونه‌های اخذ شده در منطقه قسیم در عربستان سعودی نیز تعداد این دسته از

انتروکوکوس فیسوم، لاکتوباسیلوس پاستوریانوس و لاکتوباسیلوس کازئی را تأیید کرد. جنس انتروکوکوس توزیع گسترده‌ای در محیط دارد و معمولاً بیش‌ترین تعداد باکتری‌ها در محصولات لبنی متعلق به این جنس می‌باشد. بیش‌ترین تعداد انتروکوک در ایران، در شیر بز گزارش شده است (Navidghasemizad et al., 2009; Aberal et al., 2016). در مطالعه‌ای بر روی محصولات خام و تخمیری نظیر شیر و کشک، انتروکوکوس فیسوم (۳۷/۵٪)، استرپتوکوکوس پیوژنز (*Streptococcus pyogenes*) (۱۸/۷۵٪)، استرپتوکوکوس ویریدانس (*Streptococcus viridans*) (۶/۲۵٪)، لاکتوباسیلوس کازئی (۱۸/۷۵٪) و لاکتوباسیلوس فرمنتسی (*Lactobacillus fermenti*) (۶/۲۵٪)، شناسایی شدند (Mallesha et al., 2010). انتروکوکوس فیسوم در لیست باکتری‌های اسیدلاکتیک ارائه شده توسط IDF (International Dairy Federation) می‌باشد که به‌عنوان کشت آغازگر مورد استفاده قرار می‌گیرند (Marino et al., 2003). باکتری‌های اسیدلاکتیک و متابولیت‌های آن‌ها نقشی کلیدی در کیفیت میکروبی و ماندگاری تولیدات لبنی دارند و تعدادی از آن‌ها با توجه به دارا بودن ویژگی‌های خاص تحت عنوان پروبیوتیک شناخته می‌شوند و تأثیر آنتاگونیستی آن‌ها بر برخی باکتری‌های پاتوژن نشان داده شده است (Parsaeimehr et al., 2017; Misaghi et al., 2017; Shor et al., 2017; Saughi et al., 2017). لاکتوباسیلوس کازئی به‌عنوان پروبیوتیک کاربرد دارد. اگرچه در برخی از کشت آغازگرها گزارش شده است ولی معمولاً به‌عنوان یک باکتری اسیدلاکتیک غیراستارتر موجود است (Gomes and Malcata, 1998). لاکتوباسیلوس

نمونه شیر خام $4/46 \log \text{ cfu/ml}$ گزارش شده است (Benkerroum et al., 2003). هم‌چنین در نمونه‌های کره سنتی به‌دست آمده از شیر شتر در ناحیه الجزایر جمعیت انتروکوکوس‌ها در بازه‌ای بین $2/6 \log \text{ cfu/g}$ تا $1/4$ گزارش شدند که می‌تواند ناشی از آلودگی مدفوعی در حین عمل دوشش باشد (Mourad et al., 2006). زیرا این باکتری‌ها بخشی از فلور نرمال روده بوده و از این طریق می‌توانند پستان دام و شیر را آلوده کنند (Cogan et al., 1997). در مطالعه حاضر به‌طور متوسط $3/72 \pm 0/2/75 \log \text{ cfu/ml}$ باکتری استافیلوکوکوس در نمونه‌های شیر دریافتی حضور داشتند که میزان این میکروارگانیسم در شیر خام شترهای ناحیه موروکان $5/11 \log \text{ cfu/ml}$ و در منطقه قسیم در عربستان سعودی $2/7 \log \text{ cfu/ml}$ گزارش شده است و احتمالاً بالا بودن سطح ورم پستان در ناحیه موروکان می‌تواند دلیل آن باشد (Benkerroum et al., 2003; Elemam et al., 2018). ارزیابی وضعیت کپک و مخمر در نمونه‌های شیر نشان داد که به‌طور متوسط $3/84 \pm 1/15 \log \text{ cfu/ml}$ کپک و مخمر در نمونه‌های مطالعه حاضر حضور داشتند که میزان این میکروارگانیسم‌ها در شیر خام شترهای ناحیه موروکان $4 \log \text{ cfu/ml}$ و در عربستان $4/6 \log \text{ cfu/ml}$ و در نمونه‌های شیر خام شتر کنیا $3/14 \log \text{ cfu/ml}$ گزارش گردیده است (Benkerroum et al., 2003; Elzinay et al., 2007; Wambua et al., 2011). در مطالعه حاضر متوسط تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک هوازی و بی‌هوازی به‌ترتیب $5/18 \pm 0/35 \log \text{ cfu/ml}$ و $5/24 \pm 0/42 \log \text{ cfu/ml}$ بودند. شناسایی جدایه‌های اسیدلاکتیک بر طبق آزمایشات ژنتیکی، حضور باکتری‌های انتروکوکوس فکالیس،

پاکستان مقدار این ترکیبات به ترتیب در محدوده ۱/۸ تا ۳/۲ و ۱/۸ تا ۵ درصد گزارش شده بود (Khaskheli et al., 2006). در پژوهش دیگری، مقدار پروتئین شیر خام در بازه ۳ تا ۳/۹ و مقدار چربی در محدوده ۲/۹ تا ۵/۴ گزارش شده بود (Kula et al., 2016). هم‌چنین مقدار اندازه‌گیری شده برای سایر ترکیبات از جمله خاکستر و نمک، به ترتیب $1/96 \pm 0/21$ و $1/36 \pm 0/27$ بودند. در حالی میانگین مواد معدنی و نمک در پژوهشی که روی شیر خام شتر در پاکستان انجام شده بود، این ترکیبات به ترتیب ۰/۹ درصد و ۰/۲ درصد گزارش شده‌اند (Khaskheli et al., 2006). با توجه به نتایج این ارزیابی مولکولی و هم‌چنین تحقیقات انجام شده در دنیا شیر شتر به‌عنوان یک منبع بالقوه حاوی باکتری‌های اسیدلاکتیک نظیر گونه‌های شناخته شده دارای خواص پروبیوتیکی می‌باشد که این یافته‌ها ارزش غذایی شیر شتر را بیشتر می‌کند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

پاستوریانوس از گروه لاکتوباسیل‌های هتروفرمنتاتیو می‌باشد که تقریباً اکثر گونه‌های این جنس لاکتوز را تخمیر و تولید مقادیر زیادی اسید و گاز می‌کند که در صنایع لبنی و تولید فراورده‌های تخمیری گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Frazier, 2009). در جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک شیر شترهای مصر میکروارگانیزم‌های *انتروکوکوس فکالیس*، *انتروکوکوس فیسیوم*، *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* گزارش شدند (Hamed et al., 2013). در پژوهشی روی شیر شتر منطقه اردن *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوسوس* (*Lactobacillus fermentum*)، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس برویس* (*Lactobacillus brevis*) جداسازی شدند (Abbas et al., 2014). آنالیزهای صورت گرفته روی ویژگی‌های شیمیایی شیر شتر در این تحقیق نشان داد که pH نمونه‌های اخذ شده به‌طور میانگین $6/34 \pm 0/21$ بودند. هم‌چنین pH در نمونه‌های شیر شتر در پاکستان ۶/۷ و ۶/۵ گزارش شده بود (Khaskheli et al., 2006; Kula et al., 2016). مطالعه حاضر، درصد پروتئین در دامنه ۱ تا ۳٪ و چربی ۲ تا ۳/۵٪ اندازه‌گیری شد که در نمونه‌های شیر شتر در

منابع

- Abera, T., Legesse, Y., Mammed, B. and Urga. B. (2016). Bacteriological quality of raw camel milk along the market value chain in Fafen zone, Ethiopian Somali regional state. BMC Research Notes, 9:285. DOI 10.1186/s13104-016-2088-1
- Abdel-Hameid, A., Galal Sayed, R. and Sayed, M. (2014). Nutritional value and sanitary evaluation of raw Camel's milk. Emir. Journal of Food Agriculture, 26 (4): 317-326.
- Adugna, M. and Asresie, A. (2014). Physicochemical and microbiological quality of one humped camel (*Camelus dromedarius*) milk: A Review. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare. 4(23): 119-124.

- Ahmed, T. and Kanwal, R. (2004). Biochemical characteristics of lactic acid producing bacteria and preparation of camel milk cheese by using starter culture. *Pakistan Veterinary Journal*, 24(2): 87-91.
- Ahamad, S. R., Raish, M., Ahmad, A. and Shakeel, F. (2016). Potential Health Benefits and Metabolomics of Camel Milk by GC-MS and ICP-MS. *Biological Trace Element Research*, 175(2): 322-330.
- Al-dhaheri, A. S., Al-hemeiri, R., Kizhakkayil, J., Al-nabulsi, A. and Abushelaibi, A. (2017). Health-promoting benefits of low-fat akawi cheese made by exopolysaccharide-producing probiotic *Lactobacillus plantarum* isolated from camel milk. *Journal of Dairy Science*, 100(10): 7771-7779.
- Al haj, O. and Al Kanhal, H. (2010). Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *International Dairy Journal*, 20 (12): 811-821.
- Aljumaah, R. S., Almutairi, F. F., Ismail, E., Alshaikh, M. A., Sami, A. and Ayadi, M. (2012). Effects of production system, breed, parity and stage of lactation on milk composition of dromedary camels in Saudi Arabia. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(1): 141-147.
- AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis*. 15th ed. AOAC, Arlington. VA.
- Abbas, M. M. and Mahasneh A.M. (2014). Isolation of *Lactobacillus* strains with probiotic potential from camels milk. *African Journal of Microbiology Research*, 8(15):1645–55.
- Benkerroum, N. Boughdadi, A. Bennani, N. and Hidane, K. (2003). Microbiological quality assessment of Moroccan camel ' s milk and identification of predominating lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19(6): 645–648.
- Bradley, R.L.J.E., Arnold, J.r., Barbano, D.M., Semerad, R.G., Smith D.E. and Viries, B.K. (1992). *Chemical and Physical Methods*. Inc: Standard Methods for the Examination of Dairy Products. Marshall R.T. (Ed).
- Cogan. T.M. Barbosa, M. Beuvier, E. Bianchi-Salvadori, B. Cocconcelli, P.S. Fernandes I. *et al.*, (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64(3): 409-421.
- Edalatian, M. R., Najafi, M. B. H., Mortazavi, S. A., Alegría, A., Nassiri, M.R. and Bassami, M.R. (2012). Microbial diversity of the traditional Iranian cheeses Lighvan and Koozeh, as revealed by polyphasic culturing and culture-independent approaches. *Dairy science & technology*. 92(1): 75-90.
- Elhaj, E.A.M. and AlSobeai, S.M. (2018). The Study of Bacteriological Quality of Raw Camel Milk in Middle Region (Sajir). *Kingdom of Saudi Arabia. East African Scholars Journal of Medical Science*, 1(3): 64-69.
- Ennani, B. and Hidane, K. (2004). Antimicrobial activity of camel ' s milk against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Dairy Technology*, 57(1): 39–43.
- El-Ziney, M. G. and AL-Turki, A. L. (2007). Microbiological quality and safety assessment of camel milk (*Camelus dromedaries*) in Saud Arabia (Qassim region). *Applied Biology and Environmental Research*, 5(2): 115-122.
- Faye, B., Bengoumi, M., Al-Masaud, A. and Konuspayeva, G. (2015). Comparative milk and serum cholesterol content in dairy cow and camel. *Journal of King Saud University – Science*. 27(2): 168-175
- Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. (1995). *Food Microbiology*. 4th Ed. New Delhi: Tata McGraw-Hill publishing Company Limited. pp. 384-96.
- Gizachew, A., Teha, J., Birhanu, T. and Nekemte, E. (2014). Review on medicinal and nutritional values of camel milk. *Natural Sciences*, 12(12): 35-40.

-
- Gomes, A. M. P. and Malcata, F. X. (1998). Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manufacture. *Journal of Dairy Science*, 81(6): 1492-1507.
 - Hawaz, E., Guesh, T., Kebede, A. and Menkir, S. (2016). Characterization of Lactic Acid Bacteria from Camel Milk and their Technological Properties to Use as a Starter Culture. *East African Journal of Sciences*, 10(1): 49-60.
 - Hailu, Y., Bech, E., Seifu, E., Eshetu, M. and Ipsen, R. (2016). Factors influencing the gelation and rennet ability of camel milk using camel chymosin. *International Dairy Journal*. 60: 62– 69.
 - Hassan Yassin, M., Mohamed Soliman, M., Abd-Elhafez Mostafa, S. and Ali, H. A. M. (2015). Antimicrobial Effects of Camel Milk against Some Bacterial Pathogens. *Journal of Food and Nutrition Research*, 3(3): 162–168.
 - Hamed, E. and Ellatar, A. (2013). Identification and Some Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated From Egyptian Camels Milk. *Life Science Journal*, 10(1):1952–61.
 - Jans, C., Bugnard, J., Murigu, P., Njage, K., Lacroix, C. and Meile, L. (2012). Lactic acid bacteria diversity of African raw and fermented camel milk products reveals a highly competitive, potentially health-threatening predominant microflora. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2): 371-379.
 - Jilo, K. and Dechasa, T. (2016). Chemical Composition and Medicinal Values of Camel Milk. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 4(4): 13-25.
 - Khan, B. and Iqbal, A. (2001). Production and composition of camel milk. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 38(3-4): 64–68.
 - Khaskheli, M., Arain, M. A., Chaudhry, S., Soomro, A. H. and Qureshi, T. A. (2005). Physico-Chemical Quality of Camel Milk. *Journal of Agriculture and Social Sciences*, 1(2): 164–166.
 - Khalesi, M., Salami, M., Mosehishad, M., Winterburn, J. and Moosavi-Movahedi, A. (2017). Biomolecular content of camel milk: A traditional superfood towards future healthcare industry. *Trends in Food Science and Technology*, 62: 49-58.
 - Khedid, K., Faïd, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A. Zinedine, A. (2009). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological research*, 164(1): 81-91.
 - KhKhomeri, M. Esazadeh, S. Nasrollahzade, A. (2017). Evaluation of growth inhibit of food spoilage yeast of *Lactobacillus brevis* and *Enterococcus faecium* from “chal in Iranian yoghurt drink (Doogh). *Iranian journal of Biosystem Engineering*. 47(4): 643-649.
 - Kumar, K. V., Shifow, A. A., Naidu, M. U. R. and Ratnakar, K. S. (2000). Carvedilol: A beta blocker with antioxidant property protects agent gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sciences*, 66(26): 2603–2611.
 - Mahmoudi, I., Ben moussa, O., El, T., Khaldi, M., Kebouchi, M., Soligot-hognon, C., Leroux, Y. and Hassouna, M. (2016). Functional in vitro screening of *Lactobacillus* strains isolated from Tunisian camel raw milk toward their selection as probiotic. *Small Ruminant Research*, 3-31.
 - Marth, E.H. (1978). *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 14th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
 - Mallesha, Shylaja, R., Selvakumar, D. and Jagannath, J. H. (2010). Isolation and Identification of Lactic acid bacteria from Raw and Fermented Products and their Antibacterial Activity. *Recent Research in Science and Technology*, 2(6): 42-46.
 - Marino, M. Maifreni, M. and Rondinini, G. (2003). Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 229(1):133-140.
 - Misaghi, A. Parsaeimehr, M. Akhondzadeh Basti, A. Zahraee Salehi, T. Gandomi, H. azizkhani, M. (2017). The inhibitory effects of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus* and

- Lactobacil *paracasei* isolated from yoghurt on the growth and enterotoxin a gene expression of *S. aureus*. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 11(2): 191-200.
- Moslehsad, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M. R., Ezzatpanah, H. and Moosavi-Movahedi, A. A. (2013). The proteolytic activity of selected lactic acid bacteria in fermenting cow's and camel's milk and the resultant sensory characteristics of the products. International Journal of Dairy Technology, 66(2): 279-285.
 - Mourad, K. and Eddine, N.K. (2006). Physicochemical and microbiological study of "shmen", a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid. Journal of Oils and Fats, 57(2):198-204.
 - Navidghasemizad, S., Hesari, J., Saris, P. and Nahaei, M. R. (2009). Isolation of lactic acid bacteria from Lighvan cheese, a semi hard cheese made from raw sheep milk in Iran. International Journal of Dairy Technology, 62(2): 260-264.
 - Omer, R.H. and Eltinay, A.H. (2007). Microbial quality of camel's raw milk in central & southern regions of United Arab Emirates. 10.9755/ejfa. v20i1.5182.
 - Osmondsun, T.W., Eyre, C.A., Hayden, K.M., Dhillon, J. and Garbelotto, M.M. (2013). Back to basics: an evaluation of NaOH and alternative rapid DNA extraction protocols for DNA barcoding, genotyping, and disease diagnostics from fungal and oomycete samples. Molecular Ecology Resources, 13(1): 66-74.
 - Parsaeimehr, M., Jebellijavan, A., Azizkhani, M., Keykhosravi, K., Mahdavi, A. and Khazaei, M. (2015). Microbiological and chemical evaluation of traditional Semnan province khiki cheeses. Applied Animal Science Research Journal. 15: 57-64.
 - Parsaeimehr, M., Azizkhani, M. and Jebellijavan, A. (2017). The inhibitory effect of 2 commercial probiotic strains on the growth of *Staphylococcus aureus* and gene expression of enterotoxin A. International Journal of Enteric Pathogen, 5(3): 70-75
 - Partoei, R., Gandomi, H., Akhondzadehbasti, A., Nouri, N., Nikbakht, G.H. and Kargozari, M. (2015). Microbiological and chemical properties of siahmazgi cheese, an Iranian artisanal cheese: isolation and identification of dominant lactic acid bacteria. Journal of Food Processing and Preservation, 39(6): 871-880.
 - Rashid, M. and Miyamoto, T. (2005). Quality Evaluation of Traditional Milk "Sahi" in Bangladesh. Journal Milk Science, 54(1): 29-36.
 - Sharma, C. and Singh, C. (2014). Therapeutic Value of Camel Milk. Advanced Journal of Pharmacie and Life Science Research, 2(3): 7-13.
 - Saliha, S. A. Z., Dalila, A., Chahra, S., Saliha, B. H. and Abderrahmane, M. (2013). Separation and characterization of major milk proteins from Algerian Dromedary (*Camelus dromedarius*). Emirates Journal of Food and Agriculture, 25(4): 283-290.
 - Shori AB. (2017). Camel milk and its fermented products as a source of potential probiotic strains and novel food cultures: A mini review. PharmaNutrition, 5(3): 84-88.
 - Saljooghi, S., Mansouri-Najand, L. Ebrahimnejad, H. Doostan, F. and Aska N. (2017). Microbiological, biochemical and organoleptic properties of fermented probiotic drink produced from camel milk. Veterinary Research Forum, 8(4): 313 - 31.
 - Staji, H., Rasuli, M. and Jourablou, S. (2019). Comparative virulotyping and phylogenomics of *Escherichia coli* isolates from urine samples of men and women suffering urinary tract infections. Iranian Journal of Basic Medical Science, 22(2): 211-214.
 - Wambua, D., Kaindi, M., Schelling, E., Wangoh, J., Katheriya, J., Zakaria, I. *et al.*, (2011). Microbiological Quality of Raw Camel Milk across the Kenyan Market Chain. Food, 5(1): 79-83.

“Research article”



Study of chemical and microbial characteristics of camel raw milk and identification of dominant flora of lactic acid bacteria by PCR method in Semnan

Parsaeimehr, M.^{1*}, Staji, H.², Jebellijavan, A.³, Salimi, A.¹, Arab, F.⁴, Faraki, A.⁵, Kanaani, M.⁶

1. Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
2. Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
3. Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
4. Instructor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
5. M.Sc Graduated of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
6. M.Sc Graduated of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

*Corresponding author: mparsaei@semnan.ac.ir

(Received: 2019/5/20 Accepted: 2019/11/11)

Abstract

Camel milk is considered the most important source of nutrition in terms of protein, vitamins and minerals, which is important for health. The aim of this study was to evaluate the chemical properties, microbial profile and the presence of lactic acid bacteria in camel milk. In this study, 24 samples of camel milk from Semnan's livestock farms were collected randomly during a month period and the samples were taken to the Food Health Laboratory under aseptic conditions and then analyzed for chemical and microbial assays. The percentage of protein, pH and fat percentage ranged from 1% to 3%, 6% to 6.6% and 2% to 3.5% respectively. The average number of aerobic bacteria, enterococcus, micrococcus, aerobic and anaerobic lactic acid bacteria, and mold and yeast were 6.08 ± 0.06 , 3.66 ± 0.072 , 4.14 ± 0.06 , 5.24 ± 0.42 , 5.18 ± 0.35 , 3.84 ± 1.15 log cfu/ml, respectively. It should be noted that coliform and Enterobacteriaceae were not isolated from any of the camel milk samples. *Staphylococcus aureus* was estimated from 2.78 to 4.49 cfu log/ml. In addition, identification of isolates of lactic acid bacteria was performed by sequencing of 16s rDNA. Accordingly, the isolates belong to *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus pasturianus*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. The results of this study showed microbial diversity in camel milk.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Camel milk, chemical analysis, Lactic acid bacteria