Arc JFM ID

شناسایی ایزوله‌های *انتروکوکوس* و *پدیوکوکوس* پروبیوتیک جدا شده از دو فراورده غذایی سنتی تخمیری شیری - غلاته ایرانی (کشک زرد و ترخینه)

زهره مشاک[1*]، بیژن مرادی[2]

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، ایران.

۲. کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *mashak@kiau.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۰۳

چکیده

کشک زرد استان سیستان و بلوچستان و ترخینه استان همدان و کرمانشاه دو فرآورده تخمیری شیری- غلاته می‌باشند که با پایه غلاته (گندم و جو)و یک فراورده شیری نظیر ماست، شیر تخمیر شده یا دوغ به واسطه فرایند تخمیر تهیه می‌شوند. غلات به عنوان یک غذای عملگرا قابلیت هضمی پروتئینی بالایی داشته و درضمن سوبسترای قابل تخمیر مناسبی برای رشد میکروارگانیزم‌های پروبیوتیک می‌باشد. در این مطالعه به کمک روش‌های میکروبی و بیوشیمیایی باکتری‌های جنس *انتروکوکوس* و *پدیوکوکوس* از ۴۰نمونه کشک زرد و ترخینه، جداسازی شده و سپس تایید جنس باکتری‌ها به کمک روش PCR بخشی از ژن رمز کننده 16s rRNA انجام گرفت. قطعات حاصل از PCR تعیین توالی شده و با توالی‌های موجود در بانک ژنی مقایسه شد و سویه‌های *انتروکوکوس* و *پدیوکوکوس* شناسایی گردید. با توجه به این که فراوری کشک زرد و ترخینه به کمک باکتری‌های پروبیوتیک و در جهت سلامتی مصرف کنندگان، صورت می‌گیرد؛ جداسازی و شناسایی این سویه‌های بومی و حفظ این ذخایر ژنتیکی، می‌تواند جهت گسترش استفاده از آن و همچنین صادرات به سایر کشورها مفید باشد.

واژگان کلیدی: *انتروکوکوس*، *پدیوکوکوس*، فراورده تخمیری شیری– غلاته، کشک زرد، ترخینه.

مقدمه

در دهه‌های اخیر با پیشرفت‌هایی که در زمینه بیوتکنولوژی ایجاد شده است، از طریق به کارگیری میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، تحولات چشمگیری در صنایع تخمیری مواد غذایی و دارویی ایجاد شده است. این میکروارگانیسم‌ها پس از استقرار در بخش‌های مختلف بدن از طریق بهبود بخشیدن به تعادل میکروبی میکروارگانیسم‌های طبیعی بدن، اثرات سودمندی برای مصرف کننده دارند (Conway, 1996; Holzapfel et al., 1998; Mortazavian and Sohrabvandi, 2006; Rolfe, 2000; Temmerman et al., 2003). این میکروارگانیسم‌ها در کاهش میزان کلسترول، فعالیت ضدمیکروبی علیه سایر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، ایجاد تعادل مطلوب در میکروارگانیسم‌های طبیعی بدن و کاهش عدم تحمل لاکتوز نقش بارزی دارند (Mortazavian and Sohrabvandi, 2006; Rolfe, 2000; Vasiee et al., 2018).

امروزه در دنیا به تولید و مصرف فراورده‌های غذایی تخمیری شیری- غلاته توجه خاصی می‌گردد. در این فرآورده‌ها فقر اسید آمینه‌های ضروری موجود در غلات (لیزین، ترئونین، تریپتوفان) با افزودن پروتئین حیوانی (فراورده‌های شیری تخمیری نظیر ماست، دوغ و شیر تخمیر شده) جبران می‌شود (Mashak et al., 2014; Mashak, 2016a; Ozdemir et al., 2007; Vasiee et al., 2018). از مزایای کاربرد غلات در این فراورده‌های غذایی وجود فیبر می‌باشد که سبب افزایش اثرات فیزیولوژیکی فراورده گشته و ضمناً می‌تواند به عنوان یک سوبسترای مناسب برای تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک عمل نماید (Daglioglu et al., 2002; Tamime et al., 1999). فرایند تخمیر نیز طی روند تولید این اغذیه، سبب افزایش باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک در آن‌ها می‌گردد. اسید لاکتیک و سایر اسیدهای آلی تولید شده توسط این گونه باکتری‌ها موجب کاهش

www.SID.ir

Archive of SID

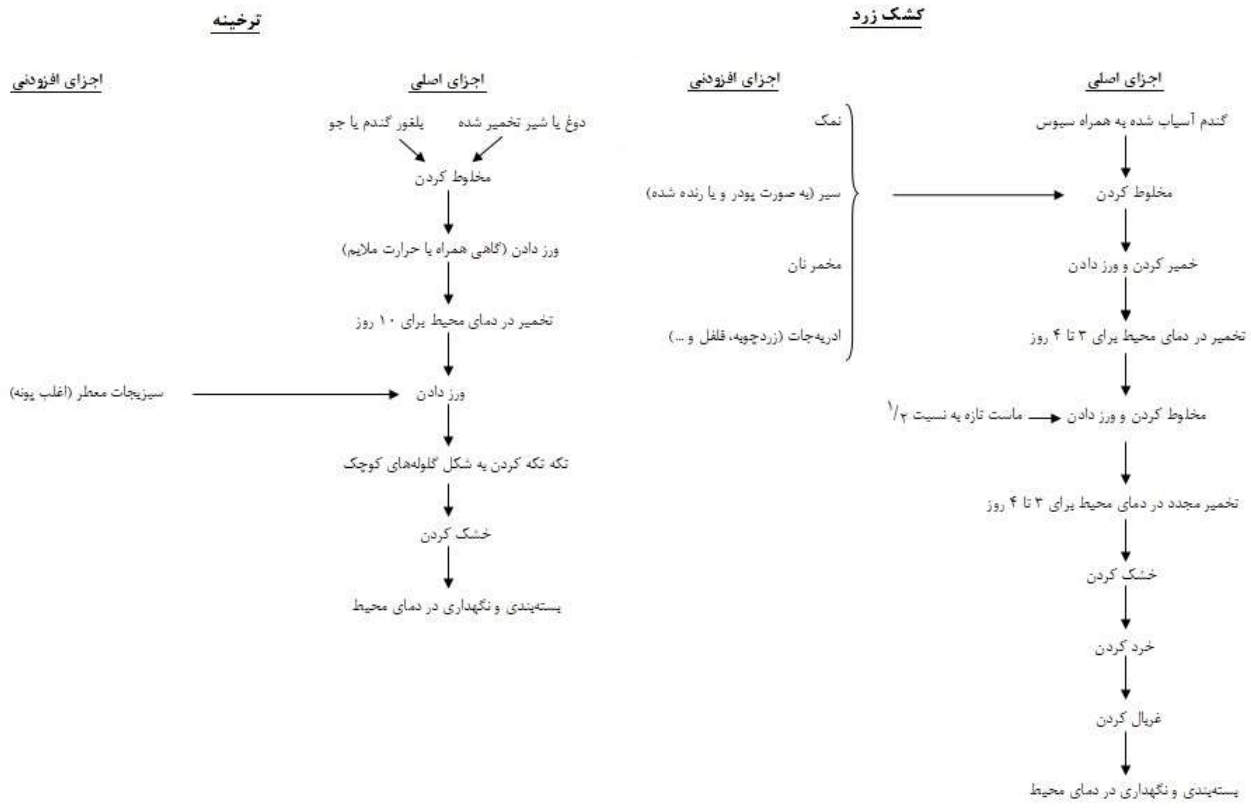
اسید فیتیک، تانن و پلی‌فنیل‌های متصل به پروتئین‌ها شده و بدین ترتیب سبب بالا بردن قابلیت فراهمی زیستی پروتئین‌ها و مواد معدنی (نظیر Ca و P) در این فراورده‌های غذایی می‌گردد (Joint FAO/WHO, 1996; Mashak et al., 2014). لذا به دلیل تولید اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه آزاد، این فراورده‌ها از قابلیت هضمی پروتئینی بیشتری برخوردار می‌باشند. همچنین این میکروارگانیسم‌ها باعث تولید مقادیر بیشتری از ویتامین‌های ریبوفلاوین، تیامین و نیاسین در فراورده غذایی می‌گردد (Erkan et al., 2006; Joint FAO/WHO, 1995; Mårtensson et al., 2002; Mashak, 2016a; Mashak, 2016b; Sengun et al., 2009).

فراورده‌های تخمیری شیری- غلاته مختلفی از جمله کیشک، ترخاینو، لبنیه، تارهانا و ربدی در نقاط مختلف جهان به خصوص آسیا، تولید می‌شود که به دلایل فوق حائز اهمیت می‌باشند (Mashak, 2016a; Mashak, 2016b; Ozdemir et al., 2007; Tamime et al., 1999; Sengun et al., 2009). کشک زرد به عنوان یک محصول تخمیری شیری- غلاته در جنوب شرقی ایران و در سیستان به صورت سنتی تولید می‌شود و مخلوطی از ماست تازه و آرد گندم، (به نسبت ۱ به ۲) و ادویه‌جات و نمک و سیر می‌باشد. کشک زرد برخلاف تمامی فراورده‌های مشابه دو مرحله تخمیر را طی می‌کند و هر مرحله ۳ الی ۴ روز طول می‌کشد که در نهایت در مجاورت هوای آزاد خشک شده و محصول نهایی به صورت گرانول‌های ریز یکنواخت، عرضه می‌شوند (Mashak et al., 2014).

ترخینه نیز که به نام‌های ترخنه و ترخوانه (کردی) و همچنین آش دوغ ترخینه (فارسی)، نیز معروف است، غذایی است آبکی که از دوغ یا شیر تخمیر شده به دست می‌آید. این غذا که جزو غذاهای سنتی استان‌های همدان و کرمانشاه محسوب می‌گردد، از مخلوط کردن بلغور گندم یا جو با دوغ و نگه‌داری آن به مدت ۱۰ روز تهیه می‌شود. پس از این مدت قطعاتی از این مخلوط خمیر مانند را گلوله کرده و گاهاً با افزودن اندکی گیاه خشک پونه آن را زیر نور آفتاب خشک می‌نمایند. تکه‌های خشک ترخینه را با افزودن حبوبات و سبزی خشک به عنوان آش آماده می‌کنند (شکل ۱) (Mashak, 2016b; Tamime et al., 1999; Sengun et al., 2009).

مطالعات بالینی مختلف انجام شده بر روی انسان نشان داده‌اند که مصرف باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک به میزان 10^{9}-10^{11} CFU/ml باکتری، میزان بروز، طول مدت و نیز شدت تعدادی از بیماری‌های دستگاه گوارش را کاهش می‌دهد (Rowland and Grasso, 1975; Soo et al., 2008). میکروارگانیسم‌هایی که بیش از همه در زمینه پروبیوتیک مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک از جمله *انتروکوکوس* و *پدیوکوکوس* هستند (In't Veld and Shortt, 1996; Mortazavian and Sohrabvandi, 2006). باکتری‌های جنس *انتروکوکوس* و *پدیوکوکوس* هر دو کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، فاقد تحرک، بی‌هوازی اختیاری و فاقد اسپور متعلق به گروه باکتری‌های اسید لاکتیک هموفرمنتاتیو هستند که گستره بزرگی از شرایط محیطی از جمله دمای ۱۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس، pH ۴ تا ۱۰ و غلظت‌های بالای کلرید سدیم را تحمل نموده و همچنین گونه‌های بسیاری از آن‌ها به صورت طبیعی در دستگاه گوارش انسان زندگی می‌کنند (Fischetti et al., 2000; Fisher and Phillips, 2009; Gilmore et al., 2002).

www.SID.ir



شکل ۱- نحوه تهیه و فراوری کشک زرد و ترخینه

گونه‌های این دو باکتری می‌توانند با تولید باکتریوسین‌های کوچک مقاوم به گرما و غیرلانتیونینی حاوی پپتیدهای متعلق به کلاس ۲ از رشد میکروب‌های بیماری‌زای خطرناک از جمله لیستریا مونوسیتوژنز، *استافیلوکوکوس ارئوس*، *ویبریو کلرا*، گونه‌های *کلستریدیوم* و *باسیلوس* جلوگیری نمایند (Gibson and Fuller, 2000; Giraffa, 2003; Rolfe, 2000).

شواهدی وجود دارد که انتروکوکوس‌ها و پدیوکوکوس‌ها می‌توانند نقش مهمی در پردازش محصولات تخمیری و همچنین توسعه ویژگی‌های حسی این فراورده‌ها بازی کنند که به نظر می‌رسد تأثیر مثبت این میکروارگانیسم‌ها از طریق ویژگی‌های بیوشیمیایی خاص آن‌ها از جمله فعالیت لیپولیتیک، استفاده از سیترات و تولید ترکیبات فرار آروماتیک باشد (Bhunia et al., 1988; Giraffa, 2003).

با توجه به این که ساختمان ژنوم و توالی‌های ژنتیکی، مشخصه‌های افتراق دهنده مهمی جهت تشخیص خانواده، جنس، گونه و سویه میکروارگانیسم به شمار می‌رود، به کمک روش PCR[1] می‌توان قطعات DNA از سلول‌های مختلف، زنجیره تکی DNA یا مولکول‌های RNA و حتی DNA از یک سلول تنها را تکثیر نموده و سویه‌های میکروارگانیسم‌های مختلف را براساس تفاوت در ژنوتیپشان تشخیص داد (Sengun et al., 2009; Gibson and Fuller, 2000; Murray et al. 2003; Mashak et al., 2014; Mashak, 2016b). در این مطالعه سویه‌های *انتروکوکوس* و *پدیوکوکوس* جداسازی شده از نمونه‌های کشک زرد و ترخینه به روش PCR مورد شناسایی قرار گرفت.

روش کار

نمونه‌برداری

از مناطق مختلف استان سیستان و بلوچستان و استان‌های همدان و کرمانشاه، به ترتیب ۲۰ نمونه ازهر یک از محصولات کشک زرد و ترخینه، در ظروف سترون جمع‌آوری شدند و تحت شرایط یخچالی، طی نهایتاً ۸

1- Polymerase Chain Reaction

www.SID.ir

Archive of SID

ساعت به آزمایشگاه گروه غذا و داروی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران منتقل گردیدند.

بررسی میکروبیولوژیکی

ابتدا میزان ۱۰ گرم از هر نمونه به ۹۰ میلی‌لیتر پپتون واتر (pH 6.3، مرک، آلمان) اضافه شده و ضمن حرارت ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم(ممرت، آلمان) به صورت دستی به آرامی چرخانده شد تا کاملاً همگن شود. از این محلول به عنوان رقت اولیه (10^{-1}) استفاده شد و به کمک رقیق‌سازی موازی در محیط پپتون واتر از نمونه‌ها رقت‌های ۱۰ برابر تهیه شد. هر رقت بر روی محیط‌های MRS آگار (مرک، آلمان) و M17 آگار (مرک، آلمان) کشت سطحی داده شده و به مدت ۳ روز در دماهای ۳۰ و ۴۲ درجه سلسیوس (انکوباتور ممرت، آلمان) گرمخانه گذاری شد. با توجه به عدم امکان شناسایی تمامی پرگنه‌ها، پرگنه‌های همشکل به عنوان یک نوع باکتری در نظر گرفته شده و تعداد احتمالی باکتری‌ها برای هر یک از نمونه‌ها مورد محاسبه قرار گرفت.

میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از نظر مورفولوژی میکروسکپی و آزمون‌های بیوشیمیایی از جمله آزمون کاتالاز، کشت بر روی محیط اسکیم میلک (مرک، آلمان)، محیط SIM (مرک، آلمان) و TSI (مرک، آلمان)، رشد در شرایط مختلف از جمله دماهای ۱۰، ۱۵ و ۴۵ درجه سلسیوس، pHهای ۴/۵ و ۹/۰ و غلظت‌های ۲، ۴ و ۶/۵ درصد نمک و قدرت تخمیر قندهای مختلف برای هر یک از میکروارگانیسم‌ها بررسی شد.

سپس هر یک از میکروارگانیسم‌های جداسازی شده، به صورت کشت خالص به محیط MRS براث (مرک، آلمان) محتوی ۱۵ درصد گلیسرول (مرک، آلمان) منتقل شد و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس (آرمینکو، ایران) نگه‌داری شدند.

شناسایی مولکولی سویه‌های جداسازی شده

بر اساس گروه‌بندی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، سویه‌های مورد نظر برای بررسی مولکولی انتخاب شده و به کمک پرایمرهای 7-f و 261-r و توسط دستگاه ژنتیک آنالایزر (ترموفیشر مدل ۳۱۳۰، ایالات متحده) ژن 16s rRNAی آن‌ها تعیین توالی شد. نتایج حاصل از تعیین توالی محصولات PCR نمونه‌های مورد آزمایش به کمک نرم‌افزار کروماس[1] نسخه ۲.۶.۴ قرائت شده و ردیف نوکلئوتیدی با توالی‌های موجود در بانک ژن توسط الگوریتم استاندارد بلاست[2] مقایسه گردید. با این کار ضمن ثبت ژن به دست آمده در پایگاه مجازی NCBI[3]، سویه میکروارگانیسم نیز بررسی گردید.

گروه‌بندی میکروارگانیسم‌های شناسایی شده بر اساس روش rep-PCR به روش نیلسن و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد (Nielsen et al., 2007). تحلیل کلاسترهای ژنی قطعات rep-PCR به کمک نرم‌افزار مگا نسخه ۷ و با استفاده از ضریب تشابه دایس انجام شد. سپس تجزیه خوشه‌ای ژن‌ها به روش UPGMA انجام شده و دندروگرام فیلوژنیک مربوطه رسم گردید

نتایج

بررسی میکروبیولوژیکی

شمارش میکروبی نمونه‌ها در محیط‌های کشت MRS و M17 در دو دمای ۳۰ و ۴۲ درجه سلسیوس در جدول ۱ نشان داده شده است. لازم به ذکر است که در هر یک از نمونه‌ها اغلب یک نوع پرگنه به صورت قابل توجهی بیشتر از سایر انواع دیگر بود که شمارش میکروبی و همچنین در مراحل بعدی شناسایی میکروبی برای همان نوع پرگنه انجام شد.

با توجه به نتایج به دست آمده تعداد میکروارگانیسم‌های شمارش شده در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بیشتر از تعداد میکروارگانیسم‌ها در دمای ۴۲ درجه سلسیوس بود.

1- Chromas LITE Ver. 2.6.4
2- Basic Local Alignment Search Tool
3- National Center for Biotechnology Information

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- انحراف معیار± لگاریتم تعداد باکتری‌های شمارش شده (Log_{10} CFU/g) نمونه‌های کشک زرد و ترخینه بر روی محیط کشت MRS و M17 در دو دمای نگه‌داری ۳۰ و ۴۲ درجه سلسیوس

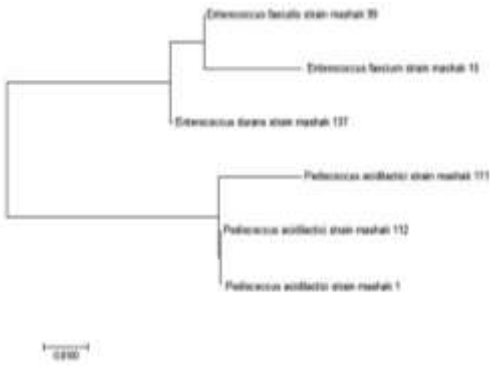
نوع نمونه	محیط کشت	دمای نگه‌داری ۳۰ درجه سلسیوس	دمای نگه‌داری ۴۲ درجه سلسیوس
کشک زرد	MRS	۳/۱۱±۰/۱۴	۲/۹۲±۰/۴۷
	M17	۳/۲۳±۰/۳۰	۳/۱۲±۰/۲۲
ترخینه	MRS	۴/۶۰±۱/۰۶	۳/۱۷±۰/۷۱
	M17	۴/۳۱±۰/۸۵	۲/۲±۰/۳۷

برای شناسایی میکروبی ۸۳ سویه مربوط به نمونه‌های کشک زرد و ۵۴ سویه مربوط به نمونه‌های ترخینه (در مجموع ۱۳۷ نوع میکروارگانیسم) جداسازی شد. در بررسی کشت و خصوصیات میکروسکپی، میکروارگانیسم‌های مشکوک به *پدیوکوکوس* دارای پرگنه‌های سفید و خاکستری، محدب و کوچک و همچنین مورفولوژی کوکسی گرم مثبت و دارای آرایش تتراد بودند. همچنین میکروارگانیسم‌های مشکوک به انتروکوکوس پرگنه‌های سفید رنگ، محدب و متوسط داشته و به شکل کوکسی گرم مثبت و با آرایش‌های تکی، دوتایی و گاهی زنجیره‌ای بودند. سویه‌های جداسازی شده کاتالاز منفی بوده و همگی دارای قدرت لخته کردن محیط اسکیم میلک و در محیط کشت SIM غیرمتحرک و اندول مثبت بودند. با توجه به نتایج به دست آمده از کشت میکروبی TSI از بین سویه‌های جداسازی شده ۵۱ سویه (۶۱/۴ درصد) مربوط به نمونه‌های کشک زرد و ۱۳ سویه (۲۴/۱ درصد) مربوط به نمونه‌های ترخینه بدون تولید H_2S و گاز CO_2 و دارای الگوی مصرف قند به صورت اسید/ اسید در محیط TSI بودند. همچنین قدرت رشد در دماهای ۱۰، ۱۵ و ۴۵ درجه سلسیوس، pHهای ۴/۵ و ۹/۰ و غلظت‌های ۲، ۴ و ۶/۵ درصد نمک برای میکروارگانیسم‌های مربوطه مورد بررسی قرار گرفت که همگی سویه‌ها توانایی رشد در شرایط مورد نظر را دارا بودند. *پدیوکوکوس*‌ها قابلیت تخمیر قندهای ریبوز، گالاکتوز، سلبیوز و تره‌هالوز را داشته و به ندرت قدرت تخمیر قندهای مانوز، سوربیتول، رافینوز، مانوز و ملزیتوز را نشان دادند. در برابر الگوی تخمیر قندها برای انتروکوکوس‌ها متغیر بود.

با توجه به نتایج به دست آمده، ۳ نوع میکروارگانیسم جداسازی شده از نمونه‌های کشک زرد و ۳ نوع میکروارگانیسم جداسازی شده از نمونه‌های ترخینه که جزء باکتری‌های غالب نمونه‌ها بوده و از نظر شکل پرگنه و خصوصیات فیزیولوژیکی بیشترین فراوانی را در بین سایر نمونه‌ها داشتند جهت بررسی مولکولی انتخاب شدند.

شناسایی مولکولی سویه‌های باکتریایی

توالی‌های 16s rRNAی میکروارگانیسم‌های مورد نظر پس از مقایسه با بانک ژنی در دو شاخه *پدیوکوکوس* و *انتروکوکوس* تقسیم‌بندی شد. باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های ترخینه به ترتیب شامل *انتروکوکوس فکالیس*، *انتروکوکوس فیسیوم* و *انتروکوکوس دورانس* بوده و گونه‌های باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های کشک زرد شماره هر سه پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی می‌باشد. در ضمن تشابه بالایی (بیش از ۹۸ درصد) بین توالی‌های شناسایی شده و توالی‌های بانک ژنی مشاهده شد.



شکل ۲- نمودار درخت فیلوژنیک مربوط به مقایسه ژنی سویه‌های جداسازی شده از نمونه‌های کشت زرد و ترخینه به کمک نرم‌افزار مگا نسخه ۷

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

تخمیر یک فرایند محدود کننده مخاطرات شیمیایی و بیولوژیکی در فرآورده‌های غذایی محسوب می‌شود و به عنوان یک روش اقتصادی از قدیم الایام جهت نگه‌داری مواد غذایی به کار می‌رفته است (Mortazavian and Sohrabvandi, 2006; Daglioglu et al., 2009). تخمیر سبب افزایش آروما، طعم، ارزش غذایی، بهبود بافت و دیگر خواص لذت‌بخش در غذا شده است و با تجزیه فاکتورهای ضدتغذیه‌ای و افزایش میزان فراهمی زیستی[1] سبب بهبود تغذیه‌ای در مواد غذایی می‌گردد (Joint FAO/WHO et al., 2002; Nielsen et al., 2007; Temmerman et al., 2003). تولید و خواص مفید فراورده‌های تخمیری مدیون فعالیت میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. زمان نگه‌داری[2] بسیاری از این محصولات به مراتب بیشتر از مواد خام سازنده آن می‌باشد. در ضمن طعم و آرومای مطلوب در این فراورده‌ها به طور مستقیم و غیرمستقیم از ارگانیسم‌های تخمیر کننده حاصل می‌شود (Mårtensson et al., 2009).

اخیراً طراحی و تولید فراورده‌های پروبیوتیکی با پایه غلاته اولاً به دلیل ارزش سلامت بخشی طبیعی آن (پروتئین، فیبر، ویتامین و املاح) و ثانیاً به سبب ایجاد تنوع در تولید و مصرف این گونه فراورده‌ها به طور چشمگیری مورد توجه قرار گرفته و بخش قابل توجهی از پژوهش‌های جاری را به خود اختصاص داده است (Ozdemir et al., 2007; Mashak, 2016a; Mashak, 2016b; Sengun et al. 2009). در گزارش نشست کمیته مشترک WHO وFAO (۱۹۹۶) نیز به فرآورده‌های تخمیری شیری-غلاته از منظر فرهنگی، وضعیت اجتماعی، صرفه اقتصادی، بالا بودن ارزش غذایی و ایمنی غذایی توجه زیادی شده است (Joint FAO/WHO. 1996).

کشک زرد استان سیستان و بلوچستان و ترخینه استان همدان و کرمانشاه نیز از این فراورده‌های سنتی تخمیری شیری - غلاته می‌باشد که از سالیان دور به عنوان فراورده‌ای مفید مورد استفاده قرار می‌گرفته است (Mashak, 2016a; Mashak et al., 2014). با توجه به شیوه تهیه این محصول، انتظار می‌رود که دارای خواص پروبیوتیکی بی‌شماری باشد که تا کنون کشف نشده است. لذا مطالعه حاضر سعی بر آن دارد که خصوصیات پروبیوتیکی کشک زرد را بررسی کرده و آن به عنوان یک محصول مفید معرفی و ارائه نماید. پیش از این نیز به خصوصیات پروبیوتیکی فراورده‌های غذایی مشابه اشاره شده است.

در مطالعه ارکن و همکاران (۲۰۰۶) که بر روی فرآورده‌ی مشابهی به نام تارهانا در ترکیه صورت گرفته است، بر خواص مفید و پروبیوتیکی این ماده غذایی نظیر، خاصیت پایین آورندگی کلسترول و تنظیم میزان گلوکز خون در دیابتی‌ها و قابلیت کاهش خطر ابتلا به سرطان در مصرف‌کنندگان، اشاره شده است (Erkan et al., 2006).

ازدمیر و همکاران (۲۰۰۷) نیز از تارهانا به عنوان یک غذای عملگرا[3] یاد نموده‌اند و از غلات در فرآورده‌های تخمیری شیری به عنوان یک سوبسترای قابل تخمیر جهت رشد میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک از جمله *انتروکوکوس* و *پدیوکوکوس* به عنوان افزایش دهنده ثبات و یا پایداری محصول غذایی و بالاخره فیبر غذایی که سبب افزایش اثرات فیزیولوژیک مفید در مصرف کننده می شود، صحبت شده است (Ozdemir et al., 2007).

بوزودی و همکاران (۲۰۱۷) خصوصیات میکروبی تراکاناس را به عنوان یک فراورده تخمیری سنتی از کشور قبرس مورد بررسی قرار دادند. به همین منظور ۱۲ نمونه از مواد اولیه و محصول نهایی تراکاناس شده

1- Bioavailability
2- Storage time
3- Functional food

www.SID.ir

Archive of SID

و در نهایت ۱۶۳ میکروارگانیسم شناسایی گردید. *لانتوکوکوس*، *لاکتوباسیلوس* و *انتروکوکوس* به عنوان میکروارگانیسم‌های غالب از نمونه‌های شیر خام جداسازی شد و پیشنهاد شد که این سویه‌های بومی جداسازی شده، جهت فراوری تجاری این محصول مورد استفاده قرار گیرد (Bozoudi et al., 2017).

انتروکوکوس‌ها و پدیوکوکوس‌ها از مهم‌ترین باکتری‌های روده‌ای پروبیوتیک هستند که فواید تغذیه‌ای و سلامتی که به آن‌ها نسبت داده می‌شود، زیاد و گوناگون است که شامل تاثیرات ضدسرطان‌زایی، افزایش فعالیت سیستم ایمنی، فعالیت ضدمیکروبی است که این خواص مدیون بقا و ماندگاری و میزان حداقلی از این باکتری‌ها در مواد غذایی می‌باشد. لذا جداسازی آن از منابع مختلف غذایی خصوصاً انواع سنتی بومی کشورمان از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (Conway, 1996; Gilmore et al., 2002; Bhunia et al., 1988).

مورنو و همکاران (۲۰۰۶) در یک مطالعه جامع کاربرد میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک جنس انتروکوکوس را در سلامت و در صنایع غذایی مورد بررسی قرار دادند. ایشان عنوان نمودند که این میکروارگانیسم‌ها به صورت سنتی در فراورده‌های غذایی تخمیری ناحیه مدیترانه از جمله فراورده‌های شیری و غیرشیری کاربرد داشته و علاوه بر فراهم کردن طعم قابل قبول، با قدرت تولید باکتریوسین‌ها و کاهش pH موجب افزایش ماندگاری ماده غذایی شده و در کنار آن موجب افزایش ظرفیت‌های سلامت‌بخش آن می‌گردند (Moreno et al., 2006).

بوزا به عنوان یک فراورده غذایی تخمیری سنتی، نوعی نوشیدنی چسبناک است که از جوی تخمیر شده، آب و شکر به دست می‌آید. تودوروف و هولزاپفل (۲۰۱۵) در یک مطالعه جامع تفاوت میکروبیولوژیکی این فراورده را در کشورهای مختلف مورد بررسی قرار دادند و وجود *انتروکوکوس* را در بوزای کشورهای بلغارستان، بورکینا فاسو، غنا و کونگو و وجود پدیوکوکوس را علاوه بر کشورهای مذکور در بوزای کنیا، سودان و اتیوپی گزارش نمودند. آنها ضمن برشمردن خصوصیات پروبیوتیکی این میکروارگانیسم‌ها، تولید ۵ نوع باکتریوسین را به صورت پپتیدهای کاتیونی توسط آن‌ها مورد تایید قرار دادند. محققین مختلف پس از استخراج میکروارگانیسم‌های تخمیری این فراورده، به کمک تکنولوژی نوترکیبی ژنتیکی، استارترهای تجاری بهبود یافته این محصول را عرضه نموده‌اند (Todorov and Holzapfel, 2015).

میزان باکتری‌های پروبیوتیک در فراورده‌های غذایی یکی از موارد قابل بحث در مطالعات مختلف است. در مطالعه داغلی اوغلو و همکاران (۲۰۰۲) تعداد باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک از 10^3 تا 10^6CFU/ml در مرحله تخمیر بود که در مرحله خشک شده به میزان 10^2 تا 10^3CFU/g کاهش یافت. تعداد میکروارگانیسم‌های شمارش شده در فراورده‌های تخمیری، بسته به نوع نمونه خام اولیه، مدت زمان تخمیر و شرایط آن، درجه حرارت نگه‌داری و روش شمارش باکتریایی متفاوت می‌باشد (Daglioglu et al., 2002).

در مطالعه حاضر این میزان Log_{10} CFU/g ۳/۲۰±۰/۰۴ گزارش گردید. ممکن است کم بودن تعداد باکتری‌ها در کشک زرد نسبت به ترخینه، به علت کهنگی و ماندن محصول به مدت طولانی باشد. تمرمن و همکاران (۲۰۰۲) انواع سویه‌های پروبیوتیک جدا شده از محصولات تخمیری را مورد بررسی قرار دادند و مشخص شد که تعداد باکتری‌های موجود در محصولات تخمیری (10^5CFU/ml) در حدود ۱/۲ برابر مکمل‌های غذایی (10^{10}CFU/ml) می‌باشد.. با توجه به این مطالعات افزایش تعداد میکروارگانیسم‌ها طی فراوری بهتر محصولات تخمیری ضروری می‌باشد (Tamime et al., 1999; Temmerman et al., 2003).

www.SID.ir

Archive of SID

در مطالعه سنگون و همکاران (۲۰۰۹) تعداد باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک در فراورده غذایی تارهانای خشک تعداد باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک نسبت به مواد اولیه کاهش یافته بود. طبق اظهار نظر وی با افزودن آب به تارهانا و سپس حرارت ملایم جهت آماده‌سازی فراورده، میزان این باکتری‌ها می‌تواند مجدداً افزایش پیدا کند. استفاده از توالی‌های 16s rDNA به عنوان یک روش قدرتمند برای تشخیص باکتری‌ها در اکوسیستم‌های پیچیده می‌باشد. سنگون و همکاران نیز در همین مطالعه انواع کوکسی را در نمونه‌های تارهانا شناسایی نموده و تکثیر توالی ژنی 16s rRNAی باکتری‌ها را با استفاده از پرایمرهای 7-f و 1510-r انجام دادند. متعاقباً ترادف توالی‌ها تعیین شده و سپس با استفاده از الگوریتم Blast ترادف‌های اصلاحی با ترادف‌های 16s rRNA در بانک اطلاعات ژنی تطابق داده شد (Sengun et al., 2009).

هولزاپفل و همکاران (۲۰۰۱) به طبقه بندی و تشریح اهمیت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در فراورده‌های غذایی پرداخته و روش‌های مولکولی از جمله PCR را بهترین روش جهت شناسایی و طبقه‌بندی این ارگانیسم نام برده‌اند (Holzapfel et al., 1998).

عیاش و همکاران (۲۰۱۸) به مطالعه استرپتوکوکوس و انتروکوکوس‌های شیر تخمیری شتر پرداختند و ضمن شناسایی مولکولی این میکروارگانیسم‌ها قابلیت پروبیوتیک آن‌ها را نیز مورد بررسی قرار دادند. وی با تعیین توالی rDNA سویه‌های جداسازی شده را شناسایی نموده و اقدام به ثبت این توالی‌ها در بانک ژن نمودند. با توجه به این نتایج *انتروکوکوس فیسیوم* سویه KX881783 و استرپتوکوکوس اکوینوس سویه KX881778 به عنوان انتخاب‌هایی مناسب جهت تولید فراورده‌های عملگرا معرفی شد (Ayyash, 2018).

در مطالعه حاضر *پدیوکوکوس* اسیدلاکتیکی از نمونه های کشک زرد جداسازی شد که چنین میکروکارگانیسمی تا کنون از این فراورده غذایی جداسازی نشده است. همچنین سه سویه *انتروکوکوس فکالیس*، *انتروکوکوس فیسیوم* و *انتروکوکوس دورانس* از نمونه‌های ترخینه جداسازی شد که نشان دهنده تفاوت میکروارگانیسم‌های تخمیری در دو فراورده مورد بررسی می‌باشد. پس از خالص‌سازی محصول PCR، توالی نوکلئوتیدی محصولات PCR نشان داد که نتایج کاملاً اختصاصی می‌باشد. با استفاده از نرم‌افزار Blast میزان مشابهت نمونه‌های جداسازی شده با نواحی 16s rDNA بسیار بالا و بیش از ۹۸ درصد بود.

تاکنون مطالعات اندکی جهت شناسایی میکروارگانیسم های آغازگر فرایند تخمیر در فراورده‌های تخمیری سنتی ایران که دارای پایه غلات باشند، انجام شده است. وسیعی و همکاران (۲۰۱۸) یک فراورده تخمیری سنتی با پایه غلات به نام حرّه را برای بررسی میکروبیولوژیکی انتخاب نمودند. در مطالعه ۱۴۰مذکور پرگنه میکروبی جداسازی شد که به کمک تعیین توالی 16s rRNA، کوکسی‌هایی چون *انتروکوکوس فیسیوم*، *انتروکوکوس فکالیس*، *لوکونوستوک سیتروم*، *لوکونوستوک مزنتروئیدس* و *پدیوکوکوس پنتازئوس* مورد شناسایی قرار گرفت (Vasiee et al., 2018).

خصوصیات شیمیایی و میکروبی دو فراورده کشک زرد و ترخینه اولین بار توسط مشاک و همکاران (۲۰۱۴) بررسی شد (Mashak et al., 2014). همچنین، کشک زرد (۲۰۱۶) به عنوان یک فراورده غذایی عملگرا از نظر میکروارگانیسم‌های آغازگر مورد بررسی قرار گرفت و گونه‌های *بیفیدوباکتریوم اینفنتیس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به روش تعیین توالی 16s rDNA شناسایی شد (Mashak, 2016a). با توجه به این‌که فراورده‌های تخمیری سنتی ایرانی از لحاظ میکروارگانیسم‌های بالقوه پروبیوتیک غنی به نظر می‌رسد در مطالعه بعدی مشاک (۲۰۱۶) سویه‌های لاکتوباسیلوس فراورده‌های تخمیری شیری-غلاته را مورد بررسی قرار گرفت. وی ۲۳ نمونه کشک زرد استان سیستان و بلوچستان و ۲۷

www.SID.ir

ArcJFMID

ترخینه استان همدان و کرمانشاه را جمع‌آوری کرده و پس از شناسایی باکتری‌های مولد اسید لاکتیک، اثرات آنتی‌باکتریال متابولیت‌های تولید شده توسط آن‌ها بر روی ۴ میکروارگانیسم مهم پاتوژن روده‌ای (*اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس ارئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا تیفی‌موریوم*) مورد بررسی قرار داد (Mashak, 2016b).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر با شناسایی کوکسی‌های مولد اسید لاکتیک در کشک زرد و ترخینه، الگوی ارگانیسم‌های آغازگر این دو فراورده تخمیری سنتی کامل‌تر شده و می‌توان درک بهتری از فرایند تخمیر و خصوصیات سلامت‌بخش آن‌ها داشت. با توجه به این که مواد اولیه، نحوه تولید، ویژگی‌های شیمیایی، مواد افزودنی و مهم‌تر از همه نوع استارتر مورد استفاده در هر منطقه جغرافیایی، می‌تواند در نوع میکروارگانیسم‌های موجود در ماده غذایی نقش داشته باشد، توصیه می‌شود که در صورت تولید این دو فراورده به صورت تجاری، فرایند تخمیر به کمک میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بومی همان منطقه صورت پذیرد. بنابراین مطالعات بیشتر جهت بررسی خواص پروبیوتیکی *انتروکوکوس* و *پدیوکوکوس*‌های جداسازی شده در این مطالعه و همچنین سایر میکروارگانیسم‌های تخمیری این دو فراورده ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

1. Ayyash, M., Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., Enan, M, El-Tarabily, K. and Shah, N. 2018. In-vitro investigation into probiotic characterization of *Streptococcus* and *Enterococcus* isolated from camel milk. LWT-Food Sci Technol. 87: 478-87.

2. Bhunia, A.K., Johnson, M.C. and Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J Appl Bact. 65 (4): 261-268.

3. Bozoudi, D., Agathokleous, M., Anastasiou I., Papademas P. and Tsaltas D. 2017. Microbiological characteristics of Trachanas, a traditional fermented dairy product from Cyprus. J Food Qual. 2017: 1-6.

4. Conway, P.L. 1996. Selection criteria for probiotic microorganisms. Asia Pacific J Clin Nutr. 5: 10-14.

5. Daglioglu, O., Arici, M., Konyali, M. and Gumus, T. 2002. Effects of Tarhana fermentation and drying methods on the fate of *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus*. Eur Food Res Technol. 215 (6): 515-519.

6. Erkan, H., Çelik, S., Bilgi, B. and Köksel, H. 2006. A new approach for the utilization of barley in food products: Barley Tarhana. Food Chem. 97 (1): 12-18.

7. Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A. and Rood, J.J. 2000. Gram-positive pathogens. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington D.C, U.S.A.

8. Fisher, K. and Phillips, C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of enterococcus. Microbiol. 155: 1749-1757.

9. Gibson, G.R. and Fuller, R. 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. J Nutr. 130: 391S-395S.

10. Gilmore, M.S., Clewell, D.B. and Courvalin P. 2002. The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance: Zondervan, ASM Press, Washington D.C, U.S.A.

11. Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. Int J Food Microbiol. 88: 215-222.

12. Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger U. and In't Veld J.H.H. 1998. Overview of gut flora and probiotics. Int J Food Microbiol. 41: 85-101.

13. In't Veld, J. and Shortt, C. 1996. Selection criteria for probiotic micro-organisms. Int Cong Symp Series - Royal Soc Med. 219: 27-36.

www.SID.ir

Archive of SID

14. Joint FAO/WHO. 1995. Fermentation - assessment and research: report of a Joint FAO/WHO Workshop on fermentation as a household technology to improve food safety, in collaboration with the Department of Health, Pretoria, South Africa.
15. Mårtensson, O., Öste, R. and Holst, O. 2002. The effect of yoghurt culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products. Food Res Int. 35: 775-784.
16. Mashak, Z., Sodagari, H., Mashak, B. and Niknafs, S. 2014. Chemical and microbial properties of two Iranian Traditional fermented cereal-dairy based foods: Kashk-E Zard and Tarkhineh. Int J Biomath. 4: 124-133.
17. Mashak, Z. 2016a. Identification of bifidobacterium strains isolated from Kashk-e Zard: A traditional Iranian fermented cereal-dairy based food. Avicenna J Clin Microbiol Infect. 3 (4): 1-5.
18. Mashak, Z. 2016b. Antimicrobial activity of Lactobacillus isolated from Kashk-e Zard and Tarkhineh, two Iranian traditional fermented foods. Int J Enteric Pathog. 4 (2): 1-5.
19. Moreno, M.F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L. 2006. The Role and Application of Enterococci in Food and Health. Int J Food Microbiol. 106: 1-24.
20. Mortazavian, A. and Sohrabvandi, S. 2006. Probiotics and food probiotic products; based on dairy probiotic products. Eta Publication, Tehran, Iran.
21. Nielsen, D.S., Teniola, O., Ban-Koffi L., Owusu, M., Andersson, T. and Holzapfel, W. 2007. The microbiology of Ghanaian Cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. Int J Food Microbiol. 114: 168-186.
22. Ozdemir, S., Gocmen, D. and Yildirim Kumral, A. 2007. A traditional Turkish fermented cereal food: Tarhana. Food Rev Int. 23: 107-121.
23. Rolfe, R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. J Nutr. 130: 396S-402S.
24. Rowland, I. and Grasso, P. 1975. Degradation of N-nitrosamines by intestinal bacteria. Appl Microbiol. 29: 7-12.
25. Sengun, I.Y., Nielsen, D.S., Karapinar, M. and Jakobsen, M. 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional turkish fermented food. Int J Food Microbiol. 135: 105-111.
26. Soo, I., Madsen, K.L., Tejpar, Q., Sydora, B.C., Sherbaniuk, R., Cinque, B., Di Marzio, L., Cifone, M.G., Desimone, C. and Fedorak, R.N. 2008. VSL# 3 probiotic upregulates intestinal mucosal alkaline sphingomyelinase and reduces inflammation. Can J Gastroenterol Hepatol. 22: 237-242.
27. Tamime, A.Y., Barclay, M.N., Amarowicz R. and McNulty D. 1999. Kishk-a dried fermented milk/cereal mixture. 1 composition of gross components, carbohydrates, organic acids and fatty acids. Le Lait. 79: 317-330.
28. Temmerman, R., Pot B., Huys, G. and Swings, J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. Int J Food Microbiol. 81: 1-10.
29. Todorov, S. and Holzapfel, W. 2015. Traditional cereal fermented foods as sources of functional microorganisms. Advances Ferm Foods Beverages. 6: 123-153
30. Vasiee, A., Behbahani, B.A., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A. and Noorbakhsh, H. 2018. Diversity and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Horreh, a traditional Iranian fermented food. Probiotics antimicrob proteins. 10: 258-268.

www.SID.ir

Identification of probiotic strains of *enterococcus* and *pediococcus* isolated from two Iranian traditional fermented dairy– cereal food products (Kashk-e-Zard and Tarkhineh)

Mashak Z[1*], Moradi B [2]

1. Department of Food Hygiene, College of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

2. Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran.

***Corresponding author:** *mashak@kiau.ac.ir*

Received: 25 October 2018 Accepted: 23 January 201*

Abstract

Kashk-e-Zard from Sistan and Baloochestan province and Tarkhineh from Hamedan and Kermanshah provinces are two cereal-dairy fermented products that are prepared by wheat based and a dairy product such as yogurt, fermented milk or doogh via fermentation process. Cereals as a functional food have a high protein digestibility and are also a fermentable substrate for the growth of probiotic microorganisms. In this study, *Enterococcus* and *Pseudococcus* genotypes were isolated from40 Kashk-e-Zard and Tarkhineh samples by microbial and biochemical methods, and then the bacterial genome was confirmed by the PCR method as part of the 16s rRNA encoding gene. The PCR fragments were sequenced and compared to the sequences in the gene bank and *enterococcus* and *pediococcus* strains were identified. Considering the processing of Kashk-e-Zard and Tarkhineh by using probiotic bacteria; therefore, isolation and identification of these strains and preserving of these genetic reserves, can be useful for the expanding its use and export to other countries.

Keywords: *Enterococcus*, *Pediococcus*, Cereal-dairy fermented product, Kashk-e-Zard, Tarkhineh**.**

www.SID.ir