شناسایی ژنتیکی مخمرهای مقاوم به سیکلوهگزامید جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی

فاطمه نجاتی [۱*]، جوانا فلیس [۲]، مهدی بابایی [۳]، فابیو فراچتی [۲]، مارتا تبالدی [۲]، ساندرا توریانی [۲]، اشکان تاج‌بخش [۴]، وحید براتی [۴]، سیروس جلیل [۴]

۱ مربی-عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، دانشکده کشاورزی
۲- دانشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه ورونا، ایتالیا
۳- مربی-عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، دانشکده کشاورزی
۴- فارغ التحصیل دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد

(تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۸)

Archive of SID

چکیده

محصولات لبنی تولید شده به روش‌های سنتی دارای فلور میکروبی بسیار پیچیده‌ای شامل میکروارگانیسم‌های همچون باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها هستند. روش رایج برای برای شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک عبارت است از کشت دادن آنها در محیط کشت‌هایی حاوی آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزامید، که با مهار سنتز پروتئین از رشد مخمرها جلوگیری می‌کند. با این حال، برخی از مخمرها مقاومت طبیعی و یا اکتسابی به این آنتی‌بیوتیک نشان داده و و بنابراین به صورت انتخابی بر روی محیط رشد می‌کنند. در این تحقیق تلاش شد تا این گروه از مخمرها از محصولات لبنی جداسازی و شناسایی شوند. بدین منظور ۲۵ نمونه محصول لبنی تولید شده به صورت سنتی در محیط کشت ام.آر.اس حاوی ۰/۰۱ درصد سیکلوهگزامید کشت داده و پس از گرمخانه‌گذاری ۴۸ (ساعت در $30^{\circ}C$)، ۳۲ کلونی که از لحاظ ظاهری به مخمرها شباهت داشتند برداشته شدند. انجام تست کاتالاز و بررسی‌های میکروسکوپی نشان‌دهنده‌ی حضور ۱۹ مخمر درمیان ۳۲ جدایه بود. پس از استخراج DNA ژنومی از هر جدایه، PCR به منظور تکثیر تصادفی قطعات DNA (RAPD-PCR) با استفاده از آغازگر M13 انجام شد تا اطلاعاتی درمورد خویشاوندی ژنتیکی میان جدایه‌ها بدست آید. مقایسه چشمی الگوهای باندی RAPD-PCR بدست آمده منجر به انتخاب ۵ مخمر به عنوان نماینده برای شناسایی بیشتر شد. در ادامه، آغازگرهای IST1 و IST4 برای تکثیر اختصاصی استفاده شدند و محصولات PCR پس از خالص‌سازی مورد آنالیز توالی‌یابی قرار گرفتند. نتایج توالی‌یابی نشان داد که همگی مخمرهای جدا شده به گونه *کلایورومایسس مارکسیانوس* تعلق دارند که گونه‌ای با توانایی تکنولوژیکی بالا است.

کلید واژه گان: محصولات لبنی سنتی، مخمرهای مقاوم به سیکلوهگزامید، شناسایی ژنتیکی، *کلایورومایسس مارکسیانوس*

* مسئول مکاتبات: f_nejati@ag.iut.ac.ir

www.SID.ir

۱- مقدمه

مخمرها یکی از ارکان اصلی فلور میکروبی محصولات غذایی غیراستریل به شمار می‌روند. در برخی از محصولات لبنی همچون نوشیدنی کفیر و کومیس حضور مخمرها نقش مهمی در بهبود خصوصیات حسی محصول و همچنین تحریک رشد باکتری‌های اسید لاکتیک دارد [۱]. با این حال، در برخی از دیگر محصولات لبنی، مخمرها میکروفلور نامطلوب به شمار می‌روند. مخمرها به خوبی در دمای پایین رشد کرده و تعدادی از آنها قادر به شکستن لاکتوز هستند و بنابراین محصولات لبنی محیط مناسبی برای رشد آنها به شمار می‌رود. همچنین این دسته از محصولات معمولاً pH اسیدی دارند که برای رشد مخمرها مطلوب است [۲]. طبق بررسی‌های انجام شده گونه‌های اصلی مخمرهای آلوده کننده محصولات لبنی اغلب به جنس‌های *کاندیدا*[1]، *دباریومایسس*[2]، *مایکودرما*[3]، *ساکارومایسس*[4] و *رودوتروولا*[5] تعلق دارند [۳-۴].

حضور مخمرهای ناخواسته اغلب مشکلاتی در محصول ایجاد می‌کند. این مخمرها نه تنها باعث ایجاد فساد و کاهش عمر نگهداری محصول می‌شوند، بلکه طی فرایند شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک و آغازگرها و یا جداسازی آنها از محیط کشت نیز ایجاد مزاحمت می‌کنند. در مورد اخیر، به منظور جلوگیری از رشد آنها در محیط کشت معمولاً از آنتی بیوتیک سیکلوهگزامید[6] استفاده می‌شود. با این وجود برخی از مخمرها نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان می‌دهند.

مقاومت به سیکلوهگزامید در میان مخمرها چندان شایع نیست. کورباچی و همکاران در سال ۲۰۱۲ پس از جداسازی مخمرهای موجود در پنیرهای ساخته شده به صورت سنتی گزارش کردند که تنها گونه‌های *کاندیدا زیلنوئیدس*[7]، *کلایوورومایسس مارکسیانوس*[8] و *پیچیا گویلیرموندی*[9] قادر به رشد در حضور ۰/۱ درصد سیکلوهگزامید هستند و در حضور ۰/۰۱ درصد سیکلوهگزامید علاوه بر مخمرها فوق گونه *کاندیدا همولونی*[10] نیز قادر به رشد ااست [۵]. نتایج مشابهی توسط یالسین و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش شده است [۶].

شناسایی مخمرها به صورت سنتی براساس استفاده از آزمون‌های فنوتیپی است که دارای معایبی همچون زمان‌بر بودن، نیاز به نیروی کار زیاد و تکرار پذیری کم است. از سوی دیگر، درستی نتایج بدست آمده با روش‌های سنتی به شرایط فیزیولوژیکی و مرحله رشد مخمر بستگی دارد [۴] . پیشرفت‌های اخیر در زمینه بیولوژی مولکولی توانسته است بر این محدودیت‌ها غلبه کرده و روش‌های مختلفی به منظور شناسایی سریع‌تر و دقیق‌تر میکروارگانیسم‌ها معرفی کند. از میان روش‌های سریع، می‌توان به تکثیر تصادفی قطعات DNA[11] (RAPD)، ژل الکتروفورز در میدان الکتریکی ضربان‌دار[12] (PFGE) و توالی‌یابی ژن‌های اختصاصی اشاره کرد. در این میان، در روش RAPD که معمولاً از یک آغازگر[13] کوچک برای تکثیر تصادفی قطعاتی از DNA استفاده می‌شود، به عنوان یک بسیار روش سریع توانایی خوبی در نمایاندن تفاوت‌های ژنتیکی در میان گونه‌های نزدیک به هم دارد [۷-۸].

در اکثر مناطق روستایی معمولاً محصولات لبنی به صورت خانگی تولید و مصرف می‌شود. تولید این محصولات معمولاً در شرایط محیطی انجام گرفته که ریسک آلودگی با مخمرهای مختلف را افزایش می‌دهد. بنابراین در این تحقیق، به منظور ارزیابی فلور مخمرهای مقاوم به سیکلوهگزامید، این محصولات مورد استفاده قرار گرفتند. بنابر بررسی‌های انجام شده در منابع، این تحقیق اولین گزارش در رابطه با شناسایی ژنتیکی فلور مخمری محصولات لبنی ایران است.

1. *Candida*
2. *Debaryomyces*
3. *Mycoderma*
4. *Saccharomyces*
5. *Rhodotorula*
6. Cycloheximide
7. *Candida zeylanoides*
8. *Kluyveromyces marxianus*
9. *Pichia guilliermondii*
10. *Candida haemulonii*
11. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)
12. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)
13. Primer

Archive of SID
www.SID.ir

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مورد استفاده

محیط کشت های MRS و M17 از شرکت بیولایف، ایتالیا تهیه شدند. به منظور رشد و تکثیر و نگهداری مخمرهای جداسازی شده از محیط کشت YPD شامل عصاره مخمر (۴ گرم در لیتر)، پپتون (۱۰ گرم در لیتر) و گلوکز (۲۰ گرم در لیتر) استفاده شد که همگی از شرکت بیولایف، ایتالیا بودند. سیکلوهگزامید، آگارز و مواد مورد استفاده در آنالیزهای ژنتیکی از سیگما، آلمان تهیه شدند. مابقی مواد شیمیایی، از محصولات شرکت مرک، آلمان استفاده شدند.

۲-۲- نمونه های لبنی و جداسازی سویه ها

بیست و پنج نمونه محصول لبنی شامل ماست، پنیر، دوغ و کشک که به صورت خانگی تهیه شده بودند از روستاهای مختلف استان چهار محال و بختیاری در ظروف استریل جمع آوری شدند و بر روی یخ به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شدند. نمونه‌ها تا زمان کشت در یخچال نگهداری شدند.

به منظور کشت، ۱۰ گرم از هر نمونه در ۹۰ میلی‌لیتر محلول ۲٪ سیترات سدیم استریل (pH = ۷/۵) که قبل از استفاده تا ۴۵ °C گرم شده بود هموژن و سپس رقت‌های لازم در محلول نمکی تریپتون (۰/۸۵٪ کلرید سدیم حاوی ۰/۱٪ تریپتون) استریل تهیه شدتد. برای تمامی نمونه‌ها، یک میلی لیتر از رقت ۵- به صورت پورپلیت در محیط کشت MRS آگار حاوی ۰/۰۱ درصد سیکلوهگزامید کشت داده شد و پلیت‌ها در °C ۳۰ گرمخانه‌گذاری شدند. پس از ۴۸ ساعت، از هر پلیت ۱ یا ۲ کلونی انتخاب برداشته شد و به محیط کشت YPD مایع منتقل شدند.

جدایه‌ها از نظر میکروسکوپی بررسی شدند و آزمون کاتالاز بر روی آنها انجام شد. جدایه‌های کاتالاز مثبت که از نظر میکروسکوپی مخمر بودن آنها تایید شد، بر روی محیط کشت YPD آگار دو بار خالص‌سازی شدند. ایزوله‌های خالص با استفاده از گلیسرول ۲۰ درصد در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۲-۳- استخراج DNA

برای تهیه ماده ژنتیکی DNA مورد استفاده در آزمون‌های PCR ، ۲ میلی‌لیتر از کشت تازه هر مخمر سانتریفیوژ شد(۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm) و سپس پلت با سرم فیزیولوژی استریل یک بار شسته شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج Bacterial Genomic DNA GeneEluent™ (سیگما) انجام شد. استخراج براساس دستورالعمل شرکت تولید کننده کیت انجام گرفت. پس از استخراج، به منظور اطمینان از انجام استخراج مناسب و بررسی غلظت آن، ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ الکتروفورز شد و شدت باند در مقایسه با مارکر MassRuler Express Reverse DNA ladder Mix (ترموساینتیفیک، ایتالیا) بیانگر استخراج مناسب DNA ژنومی بود.

۲-۴- انجام RAPD-PCR

به منظور مشاهده تفاوت‌های ژنتیکی میان ایزوله‌ها، ماده ژنتیکی با روش RAPD-PCR با استفاده از آغازگر M13 (5′ GAGGGTGGCGGTTCT 3′) آنالیز شد. واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ×۱ بافر، ۰/۱ میکرومولار از هریک از dATP، dGTP، dCTP و dTTP ، ۱/۵ میکرومولار کلرید منیزیم، ۲/۵ میکرومولار آغازگر، ۰/۵ واحد[1] آنزیم پلیمراز DNA-تک[2] و ۱ میکرولیتر DNA ژنومی انجام گرفت. سیکل تکثیر[3] شامل ۴۰ تکرار از برنامه °C ۹۴ به مدت ۲۰ ثانیه، °C ۴۵ به مدت ۲۰ ثانیه و °C ۷۲ به مدت ۲ دقیقه بود. ذوب ابتدایی DNA در °C ۹۴ به مدت ۵ دقیقه و همانندسازی[4] نهایی در °C ۷۲ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. این واکنش در ترمال سایکلر 2720 (Applied Biosystem ، آلمان) انجام گرفت. محصولات PCR پس از الکتروفورز بر

1. Unit
2. Taq-DNA polymerase
3. Amplification cycle
4. Extension

Archive of SID
www.SID.ir

روی ژل آگارز ۱/۵٪ (وزنی/حجمی) حاوی اتیدیوم برمید (۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) با استفاده از TAE ×۱ جداسازی شدند. DNA پس از پرتوتابی UV در سیستم FireReader (UVITEC Cambrige ، انگلستان) مشاهده و پروفیل RAPD-PCR عکسبرداری شد. در پایان، مقایسه الگوی‌های باندی RAPD بدست آمده برای جدایه‌های مختلف به صورت چشمی انجام شد.

۲-۵- انجام PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی و تعیین توالی[1]

بدین منظور از آغازگرهای رفت و برگشت ITS1 (5′ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3′) و ITS4 (5′ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3′) استفاده شد. واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ×۱ بافر، ۰/۱ میکرومولار از هریک از dATP، dGTP، dCTP و dTTP، ۱/۵ میکرومولار کلرید منیزیم، ۰/۵ میکرومولار از هریک از آغازگرها، ۰/۵ واحد آنزیم پلیمراز DNA–تک و ۱ میکرولیتر DNA ژنومی انجام گرفت. سیکل تکثیر۳۵ تکرار از برنامه $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۵۰ ثانیه، $^{\circ}C$ ۵۵/۵ به مدت ۵۰ ثانیه و $^{\circ}C$ ۷۲ به مدت ۱ دقیقه بود. ذوب ابتدایی DNA در $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۵ دقیقه و همانندسازی نهایی $^{\circ}C$ ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

محصولات PCR با استفاده از کیت NucleoSpin (Macherey-Nagel، آلمان) خالص‌سازی شدند و سپس قطعه تکثیر شده توسط شرکت GATC Biotech (کلن، آلمان) توالی‌یابی شد. در پایان، نتایج تعیین توالی گزارش شده توسط این شرکت با اطلاعات موجود در پایگاه ژنی NCBI (/blasthttp://www.ncbi.nlm.nih.gov) مقایسه شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- جداسازی سویه‌های مخمر

پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری، ۳۲ جدایه، با انتخاب ۱ یا دو ۲ کلونی از سطح هر پلیت، بدست آمد. در میان آنها، واکنش کاتالاز در ۱۳ جدایه منفی بود و بنابراین حذف شدند. نوزده جدایه باقیمانده با واکنش مثبت در آزمون کاتالاز از نظر مورفولوژی ارزیابی، و به عنوان مخمر تشخیص داده شدند. در جدول ۱ نام اطلاق شده به هر جدایه و منبعی که هریک، از آن جداسازی شدند آورده شده است.

جدول ۱ جدایه های مخمری مقاوم به سیکلوهگرامید بدست آمده از محصولات لبنی سنتی

شماره	نام جدایه	منشا جداسازی
۱	CY10	ماست
۲	FP101	پنیر
۳	FM14	ماست
۴	AM12	ماست
۵	BY101	ماست
۶	BY104	ماست
۷	HY10	ماست
۸	DY31	ماست
۹	BY102	ماست
۱۰	SY1110	ماست
۱۱	VY112	ماست
۱۲	DY21	ماست
۱۳	DY11	ماست
۱۴	FD21	دوغ
۱۵	JP21	پنیر
۱۶	GY101	ماست
۱۷	BY103	ماست
۱۸	GB1011	کره
۱۹	SP3	پنیر

۳-۲- آنالیز RAPD-PCR

در این مرحله به منظور تهیه یک الگوی باندی برای هر جدایه و مشاهده تفاوت‌ها میان همه جدایه‌ها از روش RAPD-PCR استفاده شد. این روش، با استفاده از آغازگرهایی همچون M13 ، $(GTG)_5$، $(GAC)_5$ و $(GACA)_4$، روش مفیدی برای ایجاد تمایز در میان گونه‌های مخمری آلوده کننده

1. Sequencing

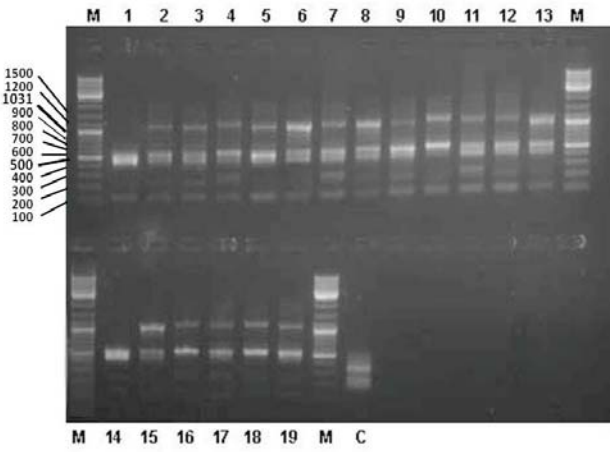
Archive of SID

www.SID.ir

مواد غذایی گزارش شده است [۹-۱۰; ۸]. در این تحقیق از آغازگر M13 استفاده شد.

در شکل ۱ الگوهای باندی RAPD-PCR برای ۱۹ مخمر جداسازی شده نشان داده شده است. تکرارپذیری الگوهای RAPD-PCR مشاهده شده برای جدایه‌ها با تکرار مجدد این آنالیز بررسی و تفاوت قابل توجهی در الگوها مشاهده نشد.

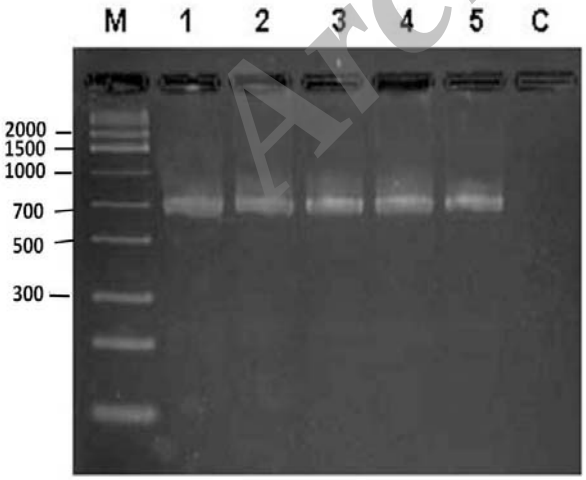
مقایسه الگوهای باندی بدست امده برای تمامی جدایه‌ها به صورت چشمی انجام شد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود الگوی باندی در اکثر جدایه‌ها تفاوت زیادی با یکدیگر ندارند و پیش بینی می‌شود تنوع بالایی در میان مخمرهای جدا شده وجود نداشته باشد. دو جدایه FD21 و CY10 دارای دو باند در حدود ۵۰۰ bp بودند و باند ۱۲۰۰ bp که تقریباً در همه جدایه‌های دیگر مشاهده شد در الگوی ژنتیکی این دو سویه وجود نداشت. FP101 ، BY101،BY104، DY31، DY11 دارای دو باند در حدود ۵۰۰ bp و یک باند در ۱۲۰۰ bp و یک باند در حدود ۱۰۰ bp هستند. جدایه های FM14، AM12 ، HY10 ، BY102 ، VY112 ، DY21 علاوه بر باندهای ذکر شده در مورد گروه قبل، دارای یک باند در حدود ۲۰۰ bp نیز بودند. جدایه های JP21 و SP3 دارای دو باند در حدود ۵۰۰ bp و یک باند در ۱۲۰۰ bp بودند. جدایه‌های GY101، BY103 و GB1011 و SY1110 دارای یک باند در حدود ۶۰۰ bp و یک باند در حدود ۱۲۰۰ bp بودند. در ادامه جدایه‌های FD21، BY101، AM12، SP3 و GB1011 از هر گروه به عنوان نماینده برای توالی یابی ژن‌های حفاظت شده انتخاب شدند.



شکل ۱ الگوی باندی بدست آمده پس از RAPD-PCR با استفاده از آغازگر M13 برای ۱۹ جدایه مخمرجداسازی شده از محصولات لبنی. ترتیب جدایه‌ها (از ۱ تا ۱۹) با ترتیب آنها در جدول ۱ برابر است. ستون M مارکر O'GeneRuler DNA Ladder Mix و C شاهد است.

۳-۳- شناسایی ژنتیکی جدایه‌ها

به منظور شناسایی دقیق مخمرها، DNA بدست آمده از ۵ جدایه انتخاب شده در مرحله قبل با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ITS1 و ITS4 مورد تکثیرسازی در PCR قرار گرفتند. آغازگرهای ITS1 و ITS4 برای تکثیر منطقه‌ای از rDNA شامل ژن 5.8S rRNA و دو منطقه ITS1[1] و ITS2 (منطقه ITS1-5.8S rDNA-ITS2) استفاده می‌شوند. بلوش[2] و همکاران گزارش کردند که منطقه 5.8S-ITS منطقه بسیار مناسبی به منظور آنالیز فیلوژنیتکی گونه‌های بسیار نزدیک به یکدیگر در مخمرها است [۱۱].



1. Internal Transcribed Spacer (ITS)
2. Belloch

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۲ الکتروفورز محصولات PCR تکثیرسازی اختصاصی با آغازگرهای ITS1 و ITS2 برای ۵ جدایه انتخاب شده. ۱: FD21، ۲: SP3، ۳: AM12، ۴: BY101 و ۵: GB1011. ستون M مارکر MassRuler Express Reverse DNA ladder Mix و ستون C شاهد است.

در این تحقیق، تکثیر این منطقه منجر به تشکیل یک قطعه تکی با وزن مولکولی حدوداً ۷۰۰ bp برای تمامی ۵ جدایه شد که در شکل ۲ مشاهده می‌شود. در سال ۱۹۹۹ استو-زارزوسو[1] و همکاران طی ارزیابی توانایی این آغازگر در شناسایی مخمرها، به بررسی ۲۴۳ سویه متعلق به ۱۳۲ گونه مخمری پرداختند [۱۲] و گزارش کردند که ۱۲ گونه مخمری متعلق به *کلایورومایسس* و چندین گونه متعلق به *کاندیدا* و *پیچیا* قادر هستند باندهایی با وزن مولکولی ۷۰۰ bp تا ۷۸۰ تشکیل دهند. کورباچی و همکاران (۲۰۱۲) نیز وزن مولکولی محصولات PCR مخمرهای مختلف با آغازگر ITS را بین ۳۸۰ bp تا ۷۳۰ گزارش کردند و مقدار ۷۳۰ bp را متعلق به گونه *کلایورومایسس مارکسیانوس* عنوان نمودند [۵]. محصولات PCR حاصل از تکثیر rDNA با آغازگرهای ITS برای هر ۵ جدایه بعد از خالص سازی، تعیین توالی شدند. نتایج حاصل از تعیین توالی نشان‌دهنده وجود ۷۰۰ تا ۷۱۰ نوکلئوتید در قطعه تکثیر شده در مورد همه ۵ جدایه بود. توالی نوکلئوتیدی گزارش شده، پس از حذف بخشی از توالی ابتدایی و انتهایی آن که کیفیت خوبی نداشتند اصلاح شد و سپس توالی باقیمانده با حداقل ۶۰۰ توالی نوکلئوتیدی برای انجام بلاست[2] در NCBI استفاده شد. براساس نتایج بدست آمده از بلاست گونه پیشنهادی برای تمام ایزوله‌ها گونه *کلایورومایسس مارکسیانوس*، با درصد شناسایی ۱۰۰٪ بود. اولین شماره دسترسی NCBI انطباق داده شده برای توالی‌های نوکلئوتیدی بلاست شده در مورد تمامی ایزوله‌ها به جز FD21، HM363381.1 و برای ایزوله FD21، KC544505.1 گزارش شد.

گونه *کلایورومایسس مارکسیانوس* یکی از گونه‌های مخمری در اکثر محصولات لبنی است و جداسازی آن از محصولات مختلف مخصوصاً پنیر گزارش شده است [۱۰; ۱۳]. البته به نظر می‌رسد درصد این مخمر نسبت به کل مخمرهای جداسازی شده از محصولات لبنی از مقدار بالایی برخوردار نیست. به عنوان مثال اکاباندا[3] و همکاران در سال ۲۰۱۰ پس از جداسازی مخمرهای یک شیر تخمیر شده سنتی عنوان نمودند که گونه *کلایورومایسس مارکسیانوس* تنها ۴/۱۷ ٪ از کل مخمرهای جداسازی شده را تشکیل می‌دهد [۱۴] و یالسین و همکاران این مقدار را ۱۸/۵٪ گزارش نمودند [۶]. از آنجا که *کلایورومایسس مارکسیانوس* گونه‌ای با خصوصیات بیوتکنولوژیکی زیاد است [۱۵] بنابراین یافتن راهی به منظور جداسازی اختصاصی آن می‌تواند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد، که در براساس نتایج این تحقیق استفاده از سیکلوهگزامید این امر را به آسانی محقق می‌سازد.

نتایج این تحقیق در تایید گزارشات پیشین مجدداً نشان داد که محصول PCR حاصل از تکثیر با آغازگر ITS برای سویه‌های مختلف *کلایورومایسس مارکسیانوس* وزن مولکولی حدود bp ۷۰۰ دارد و بنابراین به نظر می‌رسد وزن مولکولی مشاهده شده پس از الکتروفورز محصول PCR بدست آمده از تکثیر منطقه ITS1-5.8S rDNA-ITS2 می‌تواند به تنهایی روش تشخیصی باارزشی در مورد مخمرها قلمداد شود. این موضوع توسط بوکلمن[4] و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز اشاره شده است [۱۶].

از سوی دیگر، براساس این نتایج می‌توان دریافت آغازگر M13 به خوبی توانسته تفاوت‌های درون گونه‌ای در گونه *کلایورومایسس مارکسیانوس* را نشان دهد که این موضوع توسط واسدینی[5] و دک در سال ۲۰۰۳ نیز مورد اشاره قرار گرفته است [۱۰].

۴- نتیجه‌گیری

تحقیق حاضر تلاشی برای شناسایی مخمرهای مقاوم به سیکلوهگزامید تعدادی از محصولات لبنی تولید شده به روش‌های سنتی در منطقه چهارمحال و بختیاری بود. نتایج این تحقیق نشان داد که تمامی ایزوله‌های جداسازی شده به گونه *کلایورومایسس مارکسیانوس* تعلق داشته که می‌تواند بیانگر

1. Esteve-Zarzoso
2. Blast
3. Akabanda
4. Bockelmann
5. Vasdinyei

Archive of SID

www.SID.ir

شایع بودن حضور این گونه در محصولات لبنی سنتی باشد. بنابر نتایج این تحقیق، استفاده از محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزامید می‌تواند به عنوان روش مناسبی در جداسازی اختصاصی این گونه مخمری مهم مورد استفاده قرا گیرد.

براساس نتایج تحقیق حاضر، مشاهده شد اگرچه همه جدایه‌ها به یک گونه‌ی تعلق داشتند ولی آغازگر M13 مورد استفاده در روش RAPD توانایی خوبی در مشخص نمودن تفاوت میان سویه‌های مختلف گونه *کلایورومایسس مارکسیانوس* دارد که این نتیجه با نتایج گزارش شده در تحقیقات پیشین نیز مطابقت می‌کند. همچنین در ادامه این تحقیق در تایید نتایج گزارش شده در تحقیقات پیشین مشاهده شد که DNA ریبوزومی 18S تکثیر شده توسط آغازگر IST می‌تواند به خوبی در شناسایی دقیق مخمرها در حد گونه مورد استفاده قرار گیرد.

۵- سپاسگزاری

از گروه بیوتکنولوژی دانشگاه ورونا، ایتالیا به خاطر کمک‌های گرانقدر در انجام آزمایشات این تحقیق تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

۶- منابع

[1] Ferreira, A., and Viljoen, B., 2003: Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. International Journal of Food Microbiology, Vol. 86: 131-140.

[2] Fleet, G., 1990: Yeasts in dairy products. Journal of Applied Microbiology, Vol. 68: 199-211.

[3] Savova, I., and Nikolova, M., 2002: Isolation and taxonomic study of yeast strains from bulgarian dairy products. Journal of Culture Collections Vol. 3: 59-65.

[4] Lopandic, K., Zelger, S., Banszky, L., Eliskases-Lechner, F., and Prillinger, H., 2006: Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. Food Microbiology, Vol. 23: 341-350.

[5] Cobarci, C., Ucar, F.B., and Yalcin, H.T., 2012: Isolation and characterization of yeasts associated with Turkish-style homemade dairy products and their potential as starter cultures. African Journal of Microbiology Research, Vol. 6: 534-542.

[6] Yalcin, H.T., and Ucar, F.B., 2009: Isolation and characterization of cheese spoiler yeast isolated from Turkish white cheeses. Annals of Microbiology, Vol. 59: 477-483.

[7] Beh, A.L., Fleet, G.H., Prakitchaiwattana, C., and Heard, G.M., 2006, Evaluation of molecular methods for the analysis of yeasts in foods and beverages, Advances in Food Mycology, Springer, p. 69-106.

[8] Andrade, M., Rodríguez, M., Sánchez, B., Aranda, E., and Córdoba, J., 2006: DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. International Journal of Food Microbiology, Vol. 107: 48-58.

[9] Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G., and Lombardi, A., 2000: Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. Letters in Applied Microbiology, Vol. 30: 5-9.

[10] Vasdinyei, R., and Deak, T., 2003: Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. International Journal of Food Microbiology, Vol. 86: 123-130.

[11] Belloch, C., Fernández-Espinar, T., Querol, A., Dolores Garcia, M., and Barrio, E., 2002: An analysis of inter-and intraspecific genetic variabilities in the *Kluyveromyces marxianus* group of yeast species for the reconsideration of the *K. lactis* taxon. Yeast, Vol. 19: 257-268.

[12] Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A., 1999: Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. International Journal of Systematic Bacteriology, Vol. 49: 329-337.

[13] El-Sharoud, W., Belloch, C., Peris, D., and Querol, A., 2009: Molecular identification of yeasts associated with traditional Egyptian dairy products. Journal of Food Science, Vol. 74: M341-M346.

Archive of SID

www.SID.ir

[14] Akabanda, F., Owusu-Kwarteng, J., Glover, K., and Tano-Debrah, K., 2010: Microbiological characteristics of Ghanaian traditional fermented milk product, Nunu. Nature and Science, Vol. 9: 178-187.

[15] Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C., and Gombert, A.K., 2008: The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 79: 339-354.

[16] Bockelmann, W., Heller, M., and Heller, K.J., 2008: Identification of yeasts of dairy origin by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). International Dairy Journal, Vol. 18: 1066-1071.

Archive of SID

www.SID.ir

Genetic identification of cycloheximide-resistant yeasts isolated from traditional dairy products

Nejati, F. [1*], Felis, G. [2], Babaei, M. [3], Fracchetti, F. [2], Tebaldi, M. [2], Torriani, S. [2], Tajbakhsh, A. [4], Barati, V. [4], Jalil, S. [4]

1. Instructor of of Islamic azad university, Shahrekord branch, Iran
2. Department of Biotechnology, University of Verona, Italy
3. Instructor of Islamic azad university, Shahrekord branch, Iran
4. Gratuated student, Islamic azad university, Shahrekord branch, Iran

(Received: 92/2/23 Accepted: 92/10/8)

Traditional dairy products harbor a complex microbiota composed by several microbial groups, including lactic acid bacteria (LAB) and yeasts. The common method to detect LAB is to culture the products on media containing cycloheximide (CHX) to prevent yeast growth by interfering with protein synthesis. However, some yeast species and strains show natural or acquired resistance to this antibiotic and thus can be specifically selected in media with CHX. The aim of this research was to identify such CHX-resistant yeasts. To this purpose, 25 samples of home-made dairy products were plated on MRS medium with 0.01% CHX; after incubation (48 h, 30˚C), 32 colonies of presumptive yeasts were picked up. Catalase test and morphological investigation confirmed that 19 were yeasts. After DNA isolation, randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) with primer M13 was applied to gain information on genomic relatedness among isolates. Visual comparison of RAPD-PCR pattern allowed selecting five representative isolates for further analysis. Primers ITS1 and ITS4 were used for specific amplification, and the PCR-products were sequenced after purification. The results of sequencing revealed that all isolates belong to *Kluyveromyces marxianus*, a species with a high technological potential.

Key words: Traditional dairy products, Cycloheximide-resistant yeasts, Genetic identification, *Kluyveromyces marxianus*.

*Corresponding Author E_mail Address: f_nejati@ag.iut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir