جداسازی و شناسایی فلور لاکتیکی کیمچی تولید شده در ایران بر پایه روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی

فریده طباطبایی یزدی[1*]، علیرضا وسیعی[2]، بهروز علیزاده بهبهانی[2]

۱- دانشیار و عضو هئیت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۱)

چکیده

کیمچی یک اصطلاح عمومی برای سبزیجات تخمیری است. هدف از انجام این مطالعه شناسایی فلور لاکتیکی کیمچی بر پایه روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی بود. در این پژوهش پس از انجام کشت های متوالی بر روی محیط های اختصاصی و مشاهده میکروسکوپی ۸۵ جدایه که با انجام آزمایش‌های اولیه به نظر می‌رسید جزء باکتری‌های اسید لاکتیک باشند، انتخاب شده و برای گروه‌بندی آن‌ها، آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تخمیر ۱۰ نوع کربوهیدرات‌های مختلف انجام پذیرفت. بر مبنای تست‌های بیوشیمیایی و تخمیر قند ۸۵ ایزوله به ۱۰ گروه تقسیم‌بندی شدند. از هر گروه چند ایزوله انتخاب و ژن ناحیه 16S rRNA آن‌ها به کمک پرایمرهای عمومی و با تکنیک PCR تکثیر داده شد. نتایج نشان داد که تنوع باکتری‌های اسید لاکتیک کیمچی شامل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (٤١/١٧٪)، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (٩/٤١٪)، *انتروکوکوس فاسیوم* (٧/٠٦٪)، *انتروکوکوس فکالیس* (٣/٥٢٪)، *لوکونوستوک سیتریئوم* (٢/٣٣٪)، *لوکونوستوک مزنتروئیدوس* (٣/٥٢٪)،*پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* (٨/٢٣٪) و *ویسلا سیباریا* (٢٤/٧٠٪) بود. به طور کلی این فراورده‌ی تخمیری دارای تنوّع فراوانی در فلور میکروبی خود می‌باشد که از میکروفلور طبیعی موجود در مواد خام مورد استفاده نشأت می‌گیرد. با توجه به این که باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند با تولید اسیدها و آنزیم‌های مختلف نقش مهمی را در ایجاد طعم و بافت مطلوب ایفا نمایند، بنابراین می توان از سویه های جدا شده از این محصول در صنعت غذا بهره برد.

کلید واژگان: کیمچی، فلور لاکتیکی، تست های بیوشیمیایی، توالی‌یابی ژن 16S rRNA

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

۱- مقدمه

کیمچی[1] یک خوراک تخمیرشده سنتی ا است که از سبزیجات و ادویه‌جات گوناگون و البته بیشتر اوقات با نوعی کلم چینی به نام بائچو و فلفل قرمز درست می‌شود. کلمه‌ی کیمچی یک اصطلاح عمومی برای سبزیجات تخمیری است که از واژه‌ی چینی چیمچا[2] به معنی سبزی شور گرفته شده است. به صورت سنتی مقدار زیادی کیمچی به صورت سالانه تولید می‌شود که بیشتر در فصل زمستان که دسترسی به سبزیجات تازه کاهش می‌یابد مصرف می‌گردد. کیمچی در واقع نوعی شوری تهیه شده از سبزی‌های مختلف است [۱]. این محصول فعالیت‌های ایمنی را افزایش داده، روند پیر شدن را کاهش می‌دهد و از یبوست جلوگیری می‌کند، علاوه بر این کیمچی مکمل طعم سبزیجات نیز بوده و همانند یک غذای پروبیوتیک عمل می کند. به دلیل ارزش غذایی بالا، کیمچی می‌تواند منبع بسیار خوب و مناسبی از پروتئین، مواد معدنی، اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه ضروری باشد [۱]. غذاهای تخمیر شده در بسیاری از کشورها، به عنوان اجزای ضروری رژیم غذایی محسوب می شوند.

تخمیر مواد غذایی سنتی عمدتا توسط میکروارگانیسم‌های طبیعی که در مواد خام حضور دارند صورت می‌گیرد که باکتری‌های اسید لاکتیک هم جزئی از این فلور طبیعی محسوب می‌شوند. باکتری‌های اسید لاکتیک گروه بزرگ و متنوعی از باکتری‌ها را شامل می‌شود، این باکتری ها گرم مثبت، فاقد توانایی تولید اسپور، کاتالاز منفی، مقاوم به اسید، بی-هوازی اختیاری و از لحاظ ظاهری اکثرا میله‌ای یا کروی هستند که توانایی تولید اسید لاکتیک را به عنوان محصول عمده نهایی تخمیر دارا می‌باشند. باکتری‌های اسید لاکتیک یکی از فراوان‌ترین گروه باکتری‌های مرتبط با انسان هستند[۱ و ۲]. آن‌ها به طور گسترده در اکوسیستم‌های مختلف وجود دارند و معمولاً در غذاهایی هم‌چون فراورده‌های لبنی، گوشت، سبزی‌های تخمیری، خمیر ترش، سیلاژ و نوشیدنی‌های الکلی یافت می‌شوند. بشر آگاهانه یا ناآگاهانه طی هزاران سال از باکتری‌های اسید لاکتیک در تولید غذاهای تخمیری بهره برده است. این امر به خاطر توانایی این باکتری‌ها در ایجاد عطر و طعم و مهار پاتوژن‌ها و میکروارگانیسم‌های فاسدکننده می‌باشد [۲].

قبل از ظهور و گسترش روش‌های مولکولی، روش اصلی شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک بر مبنای خواص فنوتیپی باکتری‌ها بود، که شامل ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می‌باشد [۳]. از آنجایی که کاربرد روش‌های فنوتیپی در شناسایی باکتری‌ها بسیار وقت‌گیر و طولانی است و نتایج حاصل عموما از دقت بالایی برخوردار نمی‌باشد و نمی‌تواند به طور کامل و دقیق باکتری‌ها را در سطح گونه تفکیک نماید، لذا بهتر است جهت شناسایی باکتری‌ها از روش‌های مولکولی استفاده شود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای شناسایی سریع و دقیق باکتری‌های اسید لاکتیک در طی دو دهه اخیر پیشرفت فراوانی داشته است. امروزه روش توالی یابی ژن 16S rRNA به عنوان یکی از پرکاربردترین روش‌های موجود در شناسایی جمعیت میکروبی غذاهای تخمیری کاربرد دارد [۳].

براساس تحقیقات کیم و چانگ (۲۰۰۵) بر روی کیمچی، باکتری‌های اسید لاکتیک دخیل در تخمیر به جنس‌های لوکونوستوک، لاکتوباسیلوس و ویسلا تعلق داشتند. همچنین این پژوهش نشان داد که *ویسلا کورینسیس* در همه‌ی نمونه ها حضور داشت و به عنوان گونه‌ی غالب معرفی شد. در مجموع با در نظر گرفتن پژوهش‌های مختلف که بر روی کیمچی انجام شده است، بیشترین باکتری‌های اسید لاکتیک که در تخمیر کیمچی نقش دارند به ترتیب از جنس‌های ویسلا، لوکونوستوک، لاکتوباسیلوس، پدیوکوکوس و انتروکوکوس هستند [٤-٦]. مطالعات مختلف انتشار یافته در خصوص کیمچی، برخی از اختلافات مربوط به ساختار و دینامیک جمعیت را آشکار نموده است. این مطالعات بر روی کیمچی تولیدی در مقیاس آزمایشگاهی یا کیمچی تجاری خریداری شده از تولیدکنندگان مختلف به اجرا درآمده است. علاوه بر این، کیمچی یک اصطلاح عمومی برای گروهی از غذاهای تخمیرشده بر پایه‌ی سبزی‌های مختلف می‌باشد که در فرآوری آن ممکن است بیش از صد نوع سبزی مورد استفاده قرار گیرد

1. Kimchi
2. Chimchae

Archive of SID
www.SID.ir

[٧]. لذا تفاوت‌های موجود در این نتایج، چندان تعجب‌آور نبوده و می‌تواند بر اساس تفاوت در شرایط فرآوری و نوع سبزی مورد استفاده، توجیه شود.

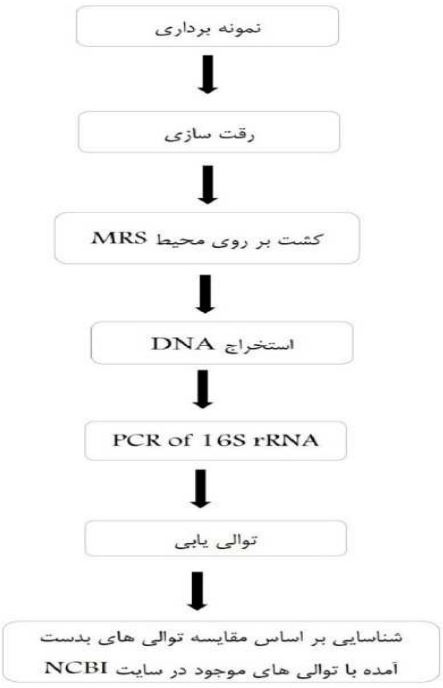
هدف از این پژوهش شناسایی و جداسازی فلور لاکتیکی کیمچی بر اساس روش های بیوشیمیایی و مولکولی می باشد، تا در نهایت با توجه به این که باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند با تولید اسیدها و آنزیم‌های مختلف نقش مهمی را در ایجاد طعم و بافت مطلوب ایفا نمایند، بتوان از سویه های جدا شده از این محصول در صنعت غذا بهره برد.

٢- مواد و روش ها

٢-١- تهیه کیمچی

مواد اولیه تولید کیمچی که شامل کلم چینی، ترب سفید، پودر فلفل قرمز، زنجبیل، عصاره ماهی و میگو، سیر، پیازچه، تره فرنگی، شکر، آرد برنج، آرد گندم و نمک از بازار های محلی در شهر مشهد خریداری شد. جهت تهیه شیرابه کیمچی ١٢٠ گرم آرد برنج و آرد گندم پس از مخلوط شدن با آب، شکر و نمک حرارت داده شد تا ژلاتینه شود، سپس ٣٠ گرم زنجبیل، ٣٠ گرم پیازچه، ٥٠ گرم سیر و ٥٠ گرم تره فرنگی را کاملا آسیاب کرده، به همراه تربچه نمک سود به آرد پخته شده اضافه شد. کاهوها با توجه به اندازه به چند قسمت تقسیم شده و به ازای هر صد گرم کاهو هفت گرم نمک بین برگ‌های آن پاشیده و به مدت شش ساعت تحت تیمار نمکی نگه داشته شدند و سپس سه بار آبکشی شدند. بعد مخلوط افزودنی‌ها و ترب سفید را به کاهو اضافه کرده و تک تک برگ‌ها کاملا به آن آغشته شد. کاهو را به همراه عصاره با نسبت ٦٠ به ٤٠ در شیشه قرار داده شد و تخمیر آن در دمای ٢٠ درجه سانتیگراد صورت گرفت تا pH آن به کمتر از ٤/٢ برسد [١ و ٨]. جهت بررسی فلور لاکتیکی کیمچی ، نمونه برداری در شرایط استریل انجام پذیرفت صورت گرفت.

آزمایشاتی که برای شناسایی فلور لاکتیکی کیمچی با کمک روش‌های مولکولی مبتنی بر کشت صورت گرفته به صورت کلی در شکل ١، آورده شده است.



شکل ١ مراحل آزمایشات مربوط به شناسایی ایزوله های متعلق به کیمچی با تکیه بر روش های مولکولی PCR 16S rRNA

٢-٢- جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک

ده گرم از نمونه به ٩٠ میلی لیتر از آب پپتون ٠/١٪ منتقل شد (مرک، آلمان) و عمل هموژنیزه شدن انجام پذیرفت (مدل Seaward، آلمان). کشت سطحی از رقت‌های تهیه شده بر روی محیط کشت MRS Agar در سه تکرار انجام شد؛ به این ترتیب که روی هر پلیت ٠/١ میلی‌لیتر از هر رقّت ریخته و به کمک اسپریدر پخش شد. در دو دمای ٣٠ و ٤٥ درجه سانتی گراد به مدت ٤٨ ساعت در شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شد تا شرایط برای رشد باکتری های نامطلوب سخت تر گردد [٩]. از پلیت‌های دارای بالاترین رقّت، کلنی‌هایی که از نظر شکل ظاهری، حاشیه‌ی کلنی، رنگ و سایر ویژگی‌های مورفولوژیکی متفاوت بودند، انتخاب شده و سپس هر کدام در پلیت جداگانه کشت خطی داده شدند و پس از چند بار کشت خطی کلنی‌های تک از هر ایزوله به‌دست آمد. برای نگهداری ایزوله ها به مدت طولانی، ایزوله ها در MRS broth حاوی گلیسرول ١٥٪ (V/V) دردمای ٨٠ -درجه سانتی گراد نگهداری شدند [١٠].

Archive of SID
www.SID.ir

۲-۳- گروه بندی باکتری‌های اسید لاکتیک بر مبنای تست‌های بیوشیمیایی و پروفایل تخمیر کربوهیدرات

بعد از ایزوله کردن، تست‌های مرفولوژیکی شامل رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی شامل تست کاتالاز، رشد در دمای مختلف ۱۰°C و ۴۵°C، زنده مانی در pH های ٤/٤ و ۹/٦ در محیط کشت MRS broth ،آزمایش لوله دورهام جهت بررسی تولید گاز CO_2 در این محیط و هم چنین رشد درغلظت نمک ٦/٥ درصد انجام پذیرفت. هیدرولیز آرژنین توسط جدایه‌ها در محیط MRS Broth بدون گلوکز و عصاره گوشت اما حاوی ۰/۳ درصد آرژنین و ۰/۲ درصد سیترات سدیم به جای سیترات آمونیوم انجام شد. سپس تولید آمونیاک توسط معرف نسلر بررسی گردید. تمامی آزمایش ها نیز در سه تکرار انجام پذیرفت [۱۱].

گروه‌بندی باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از ده نوع قند متفاوت (گلوکز، ساکارز، گالاکتوز، فروکتوز، لاکتوز، مالتوز، سوربیتول، رافینوز، مانیتول و ملی‌بیوز) و با استفاده از محیط کشت فنل رد براث (کازئین پپتون+ سدیم کلرید+ فنل رد) (کیولب، کانادا) انجام پذیرفت [۱۲].

۲-٤- شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از روش مولکولی PCR 16S rRNA

کشت‌های منجمد شده در محیط کشت MRS فعال‌سازی شدند و شناسایی بر اساس روش پلی-فازیک مولکولی که شامل استخراج DNA، تکثیر ژن 16S rRNA، توالی‌یابی و در نهایت مقایسه توالی‌ها انجام پذیرفت.

۲-٤-۱- استخراج DNA

جهت استخراج DNA ایزوله‌ها، از کیت استخراج Genomic DNA isolation VI (دنا زیست آسیا، ایران) استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون اولیه هر جدایه برای شروع کار، هر یک از ایزوله ها در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت MRS Broth تلقیح شدند و پس از ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از ۱۰۰ میکرولیتر این سوسپانسیون برای ادامه‌ی کار استفاده شد. همه‌ی مراحل مطابق دستورالعمل کیت انجام پذیرفت. در پایان برای هر جدایه محلولی ۵۰ میکرولیتری حاوی DNA جدایه بدست آمد، که برای انجام مراحل بعد در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-٤-۲- انجام واکنش PCR

برای توالی‌یابی و شناسایی دقیق ایزوله‌ها به روش مولکولی، تکثیر ژن 16S rRNA که بر اساس نواحی محافظت شده‌ی این ژن عمل می‌کند، انجام شد. برای انجام واکنش PCR از پرایمرهای عمومی ذیل استفاده شد (۱۳):

پرایمر Forward: 27FYM با توالی (5′-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3′)

پرایمر Reverse: 1492R با توالی (5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)

مشخصات مخلوط واکنش در جدول ۱، آورده شده است.

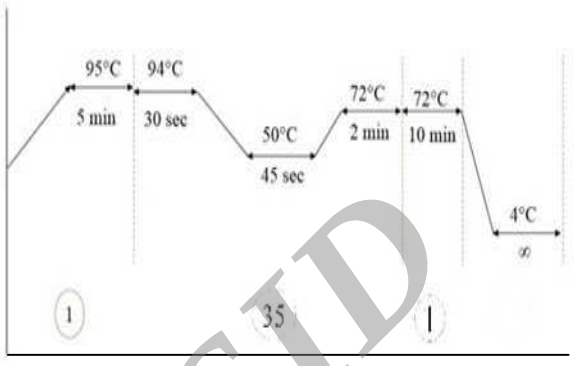
جدول ۱ مشخصات اجزای واکنش دهندهPCR

اجزای تشکیل دهنده‌ی واکنش	حجم مورد استفاده (میکرولیتر)	غلظت نهایی در واکنش
DNA الگو	۱/٥	۳ ng/µl
بافر PCR (۱۰ X)	۲/٥	۱X
پرایمر پیشرو (۲۵ mM)	۱	۱ mM
پرایمر معکوس (۲۵ mM)	۱	۱ mM
DNTPs (۱۰ mM)	۲	۰/۳۲ mM
کلرور منیزیم (۵۰ mM)	۱/٥	۲/٥ mM
آنزیم DNA-Taq پلیمراز (۵۰ U/µl)	۰/۲	۱ U/µl
آب دوبار تقطیر استریل	۱٥/٥	-
جمع	۲٥	-

Archive of SID

www.SID.ir

سپس میکروتیوب حاوی مخلوط واکنش‌دهنده‌های PCR را داخل دستگاه ترموسایکلر Sensquest (Germany) قرار داده و برنامه‌ی دمایی و تعداد سیکل‌هایی مطابق شکل ٢، به دستگاه داده شد.



شکل ١ پروفایل برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر 16S rRNA [١٠]

٢-٤-٣-الکتروفورز محصول PCR

برای این منظور ژل آگارز ١٪ در بافر TBE (تریس، اسید بوریک، EDTA) تهیه شد. از DNA green viewer (پارس توس) جهت مشاهده‌ی باندها زیر نور UV استفاده شد. سپس ٣μl از محصول PCR داخل ریخته شد. در چاهک‌های ردیف اول و آخر هر ردیف، به میزان ١μl مارکر استفاده شد. همچنین آخرین چاهک به عنوان کنترل منفی استفاده شد. الکتروفورز در ولتاژ ٩٥ ولت و زمان ٤٥ دقیقه انجام پذیرفت. پس از اتمام الکتروفورز از ژل موردنظر توسط دستگاه Gel Document تحت اشعه‌ی ماوراء بنفش عکس‌برداری صورت گرفت (١٤ و ١٥).

٢-٤-٤- تعیین توالی جدایه‌ها

پس از ارزیابی صحت انجام واکنش PCR توسط الکتروفورز و مشاهده‌ی باند در موقعیت ١٥٠٠ جفت بازی محصولات واکنش PCR جهت تعیین توالی به صورت خوانش یک طرفه از پرایمر 27F، به شرکت Macrogen کره ارسال شدند. پس از خوانش مجدد برای برخی ایزوله‌ها که در خوانش اولیه نتیجه‌ی مطلوبی برای آن‌ها حاصل نشده بود، توالی‌های بدست آمده با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی (NCBI)، BLAST شده و مشابه‌ترین سویه به ایزوله‌ی موردنظر تعیین گردید. تشابه بالای ٩٧ درصد به عنوان تشابه معنی‌دار تلقی شد.

٣- نتایج و بحث

٣-١- نتایج آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک نمونه‌های کیمچی در جدول ٢، آورده شده است. همانگونه که ملاحظه می‌شود میزان باکتری‌های مزوفیل در نمونه‌های کیمچی غالب‌تر می‌باشد. بیشترین تعداد شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک در دمای ٣٠ درجه سانتی‌گراد متعلق به نمونه شماره ٣ و بیشترین میزان شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد متعلق به نمونه شماره ٤ می‌باشد.

جدول ٢ اندازه‌گیری pH و شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک نمونه‌های کیمچی (CFU/g) در دماهای مختلف ٣٠ و ٤٥ درجه سانتی‌گراد بر روی محیط کشت MRS

	نمونه‌های کیمچی					
	نمونه ١	نمونه ٢	نمونه ٣	نمونه ٤	نمونه ٥	نمونه ٦
pH	٣/٥٤	٣/٨٧	٤/١٢	٣/٠٥	٣/٩٠	٣/٣٨
MRS (30°C)	٦/٣٠±٠/٢٣	٦/٤٥±٠/١٧	٧/٨٢±٠/٤٢	٧/١٢±٠/٣٠	٧/٤٨±٠/١٢	٦/٩٥±٠/٣٣
MRS (45°C)	٤/٢٥±٠/١٠	٣/٥٦±٠/٢٥	٤/٠٣±٠/١٨	٤/٨٢±٠/٣٥	٣/٢٣±٠/٣٠	٤/٤٥±٠/٢٦

پس از انجام رنگ آمیزی گرم و بررسی مورفولوژی جدایه‌ها و نیز انجام تست کاتالاز، ٨٥ جدایه از مرحله پایانی تخمیر که گرم مثبت و کاتالاز منفی بوده و ویژگی‌های مورفولوژیکی و شکل کلنی‌های آن‌ها با باکتری‌های اسید لاکتیک هم‌خوانی داشت برای انجام تست‌های بعدی انتخاب شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

۸۵ جدایه‌ی انتخاب شده بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی در حد جنس شناسایی گردیدند (جدول ۳). بر این اساس، گروه یک در برگیرنده‌ی باسیل‌های هوموفرمنتاتیوی بود که در دمای ۱۰°C و pH=٤/٤ رشد کرده، امّا قادر به هیدرولیز آرژنین نبودند، این گروه به عنوان لاکتوباسیلوس‌های هوموفرمنتاتیو شناسایی شدند. گروه دوم دربرگیرنده‌ی باسیل‌های هتروفرمنتاتیوی بود که آرژنین را هیدرولیز نموده و در دمای ۱۰°C و pH=۹/٦ به خوبی رشد می‌کردند، این گروه به عنوان لاکتوباسیلوس‌های هتروفرمنتاتیو در نظر گرفته شدند. گروه سوم شامل باسیل‌های کوتاه گرم مثبت، کاتالاز منفی و هتروفرمنتاتیو که آرژنین را هیدرولیز نموده و در دماهای ۱۰°C و ٤٥°C قادر به رشد بودند، امّا در pH=۹/٦ رشد نکردند، این گروه به عنوان ویسلا شناسایی گردیدند. گروه چهار شامل کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و هوموفرمنتاتیو با آرایش سلولی تتراد بود که در دمای ۱۰°C و pH=۹/٦ رشد نکرده، امّا قادر به رشد در غلظت ٦/٥ درصد نمک بودند و به عنوان پدیوکوکوس شناسایی شدند. در گروه پنج کوکسی‌هایی قرار داشتند که ویژگی‌هایی شبیه به گروه ۳ داشتند با این تفاوت که قادر به رشد در ٤٥°C و هیدرولیز آرژنین نبودند، این گروه به عنوان لوکونوستوک در نظر گرفته شدند. و در نهایت کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، هوموفرمنتاتیو قادر به رشد در دماهای ٤٥°C و نیز قادر به رشد در غلظت ٦/٥ درصد نمک؛ که در pH=٤/٤ و pH=۹/٦ نیز رشد نمودند در گروه شش جای گرفته و به عنوان جنس انتروکوکوس در نظر گرفته شدند. [١٦- ١٩].

جدول ۳ نتایج آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های کیمچی

شماره گروه	درصد (٪)	رشد در ۱۰°C	رشد در ٤٥°C	رشد در pH=٤/٤	رشد در pH=۹/٦	رشد در ٦/٥٪ نمک	هیدرولیز آرژنین	تولید گاز Co_2
۱	٤۱/۱۷	+	−	+	±	±	−	−
۲	۹/٤۱	+	±	−	+	−	+	+
۳	۲٤/۷۰	+	+	±	−	±	+	+
٤	۸/۲۳	−	±	+	−	+	+	−
٥	٥/۸۸	+	−	±	−	±	−	+
٦	۱۰/٥۸	+	+	+	+	+	+	−

+ رشد باکتری − عدم رشد باکتری

۳-۲- نتایج آزمایش تخمیر کربوهیدارت‌های مختلف

امروزه نتایج شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک با روش‌های فنوتیپی (حتی استفاده از کیت API) به هیچ عنوان معتبر و موثّق نبوده و نتایج رضایت بخشی ارائه نمی‌دهد. به این دلیل از نتایج حاصل از تخمیر کربوهیدرات‌ها صرفاً برای گروه‌بندی جدایه‌ها استفاده شد تا بر اساس این نتایج از هر گروه چند جدایه جهت شناسایی دقیق با روش مولکولی انتخاب شوند. بر این اساس جدایه‌ها در ۱۰ گروه طبقه بندی شدند، مبنای انتخاب و مقایسه‌ی قندها جلد سوم کتاب Bergey's Systematic Manual of بود. جدول ٤، نتایج حاصل از گروه‌بندی باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از روش تخمیر کربوهیدرات را نشان می‌دهد. ۹/٤۱ درصد جدایه‌ها (شامل ۸ جدایه) در گروه یک قرار گرفتند؛ که بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی لاکتوباسیلوس‌های هتروفرمنتاتیو بودند، ۲۳/٥۲ درصد (شامل ۲۰ جدایه) در گروه دو و ۱۱/۷٤درصد (شامل ۱۰ جدایه) در گروه سه قرار گرفتند؛ جدایه‌های این دو گروه قبلا به عنوان لاکتوباسیلوس‌های هوموفرمنتاتیو شناسایی شده بودند. همه‌ی جدایه‌هایی که قبلا به عنوان جنس ویسلا شناسایی شدند یعنی ۲٤/۷۰ درصد جدایه‌ها (شامل ۲۱ جدایه)

Archive of SID

www.SID.ir

در گروه چهار قرار گرفتند. همه‌ی جدایه‌هایی که به جنس پدیوکوکوس تعلّق داشتند (٨/٢٣ درصد، شامل ٧ جدایه) در گروه پنج قرار گرفتند. گروه شش نیز با داشتن ٥/٨٨ ٪ جدایه-ها (٥ جدایه) متعلق به گروه باسیل‌های هووفرمنتاتیو بود. گروه هفت، با داشتن ٣/٥٢٪از جدایه‌ها (شامل ٣ جدایه) و گروه هشت ٢/٣٥ درصد از جدایه‌ها (٢ جدایه) را شامل شدند؛ این دو گروه بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی به عنوان جنس لوکونوستوک شناخته شده بودند. و سرانجام جدایه‌هایی که قبلاً بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی به عنوان انتروکوکوس شناسایی شده بودند در دو گروه نه و ده قرار گرفتند؛ ٣/٥٢٪ از جدایه‌ها (شامل ٣ جدایه) در گروه نه و ٧/٠٦٪ (شامل ٦ جدایه) در گروه ده [١٢].

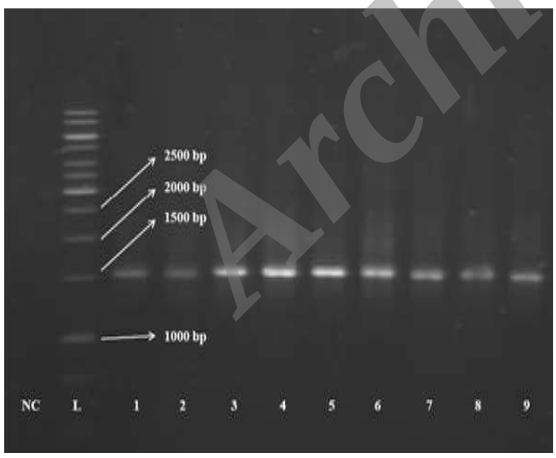
جدول ٤ نتایج حاصل از تخمیرکربوهیدرات‌های مختلف توسط جدایه‌ها

	شماره گروه									
کربوهیدرات	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠
گلوکز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ساکارز	+	+	+	+	V	+	+	+	−	+
گالاکتوز	+	+	+	−	+	+	−	+	+	+
فروکتوز	+	+	−	+	+	−	+	+	+	+
لاکتوز	+	−	−	−	+	−	−	+	+	+
مالتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
سوربیتول	−	+	+	V	−	+	−	−	−	−
رافینوز	−	V	+	−	−	−	−	−	+	−
مانیتول	v	+	+	−	−	+	+	+	V	+
ملیبیوز	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−

V: نتایج یکسانی برای همه‌ی جدایه‌ها بدست نیامد

٣-٣- شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک کیمچی با کمک روش مولکولی

با توجه به گروه‌بندی که توسط آزمایش‌های مبتنی بر کشت به دست آمد، در مجموع ٢٣ جدایه از گروه‌های مختلف انتخاب و مورد آزمون قرار گرفت. ابتدا DNA جدایه‌های مورد نظر استخراج شد. در مرحله‌ی بعد با کمک پرایمرهای عمومی 27FYM و 1492R تکثیر ژن 16S rRNA انجام گرفت. باندهای ایجاد شده از نظر اندازه در مکان ١٥٠٠ جفت بازی بودند (شکل ٢).



شکل ٢ باندهای ١٥٠٠bp حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA. NC: کنترل منفی، L: نشانگر[3] 1kp، ٩-١: جدایه‌های کیمچی

3. Ladder

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج توالی‌یابی نشان داد که جمعیت غالب متعلق به جنس لاکتوباسیلوس می‌باشد که به دو جنس *پلانتاروم* (۴۱/۱۷) و *فرمنتوم* (۹/۴۱) تقسیم می‌شدند. بقیه باکتری‌ها متعلق بودند به جنس‌های: *ویسلا* (*سیباریا*) (۲۴/۷۰)، *پدیوکوکوسپنتوزاسئوس* (۸/۲۳)، *انتروکوکوس* (*فکالیس* و *فاسیوم*) (۱۰/۵۸) و *لوکونوستوک* (*سیترئوم* و *مزنتروئیدوس*) (۵/۸۷). نتایج حاصل از توالی‌یابی در جدول ۵، آورده شده است.

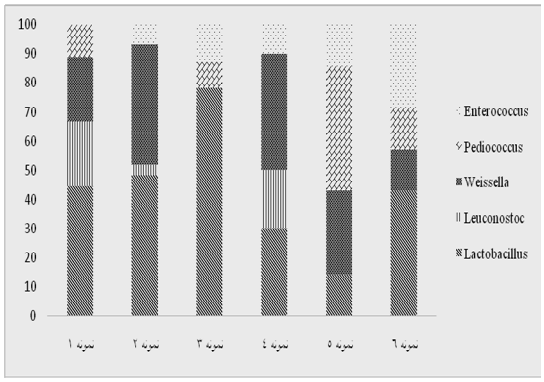
جدول ۵ شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک کیمچی با استفاده از روش مولکولی

کد جدایه	نزدیک‌ترین سویه در پایگاه داده NCBI	درصد شباهت (٪)	کد دسترسی
B33	*Lactobacillus plantarum* WCFS1	99	NR_075041.1
C13	*Leuconostoc citreum* KM20	99	NR_074694.1
A71	*Lactobacillus plantarum strain IMAU32489*	100	KF149163.1
E8	*Enterococcus faecium* Aus0004	98	NR_102790.1
B28	*Lactobacillus fermentum* IFO 3956	99	NR_075033.1
G21	*Weissella cibaria* II-I-59	100	NR_036924.1
E22	*Lactobacillus plantarum strain KLDS 1.0725*	100	EU626010.1
C32	*Lactobacillus plantarum* strain KLDS 1.0725	98	EU626010.1
B12	*Lactobacillus fermentum strain KLDS 1.0613*	99	EU419592.1
A55	*Pediococcus pentosaceus ATCC 25745*	100	NR_075052.1
E18	*Enterococcus faecium* strain FS019	100	KC568549.1
C13	*Weissella cibaria* II-I-59	100	NR_036924.1
C12	*Lactobacillus plantarum strain IMAU32489*	98	KF149163.1
A16	*Lactobacillus plantarum* WCFS1	99	NR_075041.1
B32	*Lactobacillus fermentum strain FQ002*	100	KF418815.1
B19	*Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745	99	NR_075052.1
A20	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293	98	NR_074957.1
A4	*Lactobacillus plantarum strain KLDS 1.0725*	100	EU626010.1
G12	*Leuconostoc citreum* KM20	100	NR_074694.1
A60	*Weissella cibaria* KACC 11862	100	AEKT01000000
C4	*Lactobacillus plantarum* PD412	100	AB854180.1
B34	*Enterococcus faecalis V583 strain V583*	98	*NR_074637.1*
E51	*Weissella cibaria* II-I-59	100	NR_036924.1

برای درک هر چه بهتر اکولوژی باکتری‌های اسید لاکتیک نمونه‌های کیمچی، توزیع جمعیت باکتریایی با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت در شکل ۳، آورده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود توزیع جمعیت در اغلب نمونه‌ها به خوبی اتفاق افتاده است.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ٣ توزیع باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در نمونه‌های کیمچی

همانطور که قبلا نیز اشاره شد تخمیر به وسیله‌ی میکروارگانیسم‌های اولیه‌ی موجود در بافت سبزی اولیه شروع می‌گردد و به طور طبیعی جنس‌های لاکتوباسیلوس، لوکونوستوک و پدیوکوکوس بر روی گیاهان یافت می‌شوند [٢٠]. سویه‌های جنس ویسلا نیز به طور گسترده‌ای در طبیعت پراکنده هستند. *ویسلا سیباریا* در غذاهای تخمیری بسیاری (کاساوا[4]،خمیر ترش و نوشیدنی ژاپنی الکی شوچو[5]) یافت شده است [٢١، ٢٢ و٢٣]. نتایج تحقیق امرنینی و همکاران (٢٠١٣)، نشان داد که گونه‌های ویسلادر سبزی‌ها و میوه‌های تازه گونه‌ی غالب هستند. بر اساس این مطالعه، گونه‌ی غالب در سبزی‌های تازه *ویسلا سیباریا* بود و پس از آن نیز *ویسلا کانفیوز* قرار داشت [٢٤]. نخستین مطالعات مبتنی بر استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی میکروارگانیسم‌های جدا شده از کیمچی، اغلب به موازات تعیین خصوصیات فنوتیپی صورت گرفته‌اند. به عنوان مثال چوی و همکاران (٢٠٠٢)، با استفاده از تعیین توالی ژن 16S rRNA نشان دادند که ٦٨ درصد از ١٢٠ باکتری اسید لاکتیک جدا شده از کیمچی، متعلق به گونه‌ی *لوکونوستوک سیترئوم* هستند. سایر گونه‌های غالب شامل *لاکتوباسیلوس ساکی*،*لاکتوباسیلوس ساکی*،*لاکتوباسیلوس ساکی* و *ویسلا کانفیوزا* بودند. *لوکونوستوک پنتوزاسئوس* در حین مراحل اولیه و میانی تخمیر کیمچی، غالب بود در حالی که سایر باکتری‌ها در مراحل بعدی مشاهده شدند [٤]. درصد پایین جدایه‌هایی که به عنوان لوکونوستوک در این پژوهش شناسایی شدند، می‌تواند به دلیل توانایی رقابت پایین اعضای این جنس با سایر باکتری‌های اسید لاکتیک و نیز عدم توانایی رشد در pH های پایین باشد. همچنین می‌توان قدرت ضعیف این جنس در رشد بر روی محیط انتخابی و در نتیجه دشواری جداسازی آن را نیز یکی دیگر از دلایل حضور کم رنگ این جنس دانست [١٨ و ٢٥.] چو و همکاران (٢٠٠٦) در مطالعه‌ی دیگری جهت تعیین تنوع میکروبی با استفادهاز روش‌های مختلف مبتنی بر تکثیر ژن 16S rRNA بر پایه‌ی آزمون آنزیم‌های برش‌دهنده، مشخص نمودند که ٩٧٠ باکتری جدا شده از کیمچی متعلق به ١٥ گونه از جنس‌های لاکتوباسیلوس، لوکونوستوک و ویسلا هستند. با بررسی تاثیر دمای تخمیر توسط این محققان، مشاهده شد که گرمخانه‌گذاری مقدماتی دو روزه در ١٥ درجه سانتی‌گراد برای جنس لوکونوستوک مطلوب است؛ در حالی که گونه‌ی *ویسلا کورینسیس* در مرحله‌ی دوم تخمیر که در دمای ١- درجه سانتی‌گراد انجام شد، غالب می‌گردد [٢٦]. مطالعات دیگری بر روی فلور میکروبی کیمچی با استفاده از روش‌های مستقل از کشت صورت گرفته است. ارزیابی کتابخانه‌های همسانه‌سازی ژن 16SrRNA با استفاده از برش محدود DNA ریبوزومی تکثیریافته (ARDRA) و تعیین توالی آن نشان داد که *ویسلا کورینسیس* تنها گونه‌ی موجود در تمام نمونه‌های کیمچی حاصل از پنج واحد تولیدی بود. در واقع این سویه مهم‌ترین گونه‌ی غالب و پس از آن جنس‌های لوکونوستوک و لاکتوباسیوسگزارش شدند [٢٧]. لی و همکاران (٢٠٠٥) با استفاده از PCR-DGGE برای بررسی جمعیت میکروبی، دریافتند که در نمونه‌های کیمچی تخمیرشده در دماهای ١٠ و ٢٠ درجه سانتی‌گراد به ترتیب به مدت ٣٠ و ٢٠ روز تا ١٢ باند مشاهده می‌شود. نتایج تعیین توالی نشان داد که میکروارگانیسم‌های اصلی مسئول در تخمیر کیمچی *ویسلا کانفیوزا*، *لوکونوستوک سیترئوم*، *لاکتوباسیلوس ساکی* و *لاکتوباسیلوس کارواتوس* بودند. باندهای *ویسلا کانفیوزا*و *لوکونوستوک سیترئوم*در طول فرایند تخمیر باقی ماند که اهمیّتآن‌ها را در تخمیر کیمچی نشان می‌دهد. *لاکتوباسیلوس ساکی* و *لاکتوباسیلوس کارواتوسنیز* به عنوان اجزای شاخص در جمعیت باکتریایی شناسایی گردیدند [٦]. *پدیوکوکوس*

4. Cassava
5. Shochu

Archive of SID
www.SID.ir

*پتوزاسئوس*در بسیاری از تخمیرهای گیاهی نقش دارد و در تخمیر این فراورده نیز حضور داشت، که می‌توان آن را به تحمّل غلظت زیاد نمک و قدرت تطبیق بالای این سویه با شرایط اسیدی نسبت داد [۱۱]. تخمیر لاکتیکی در گیاهان وابسته به یک ارگانیسم خاص نیست بلکه گروهی از میکروارگانیسم‌ها در آن شرکت دارند. به طوری که در ابتدا طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها حضور دارند که شامل باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی، قارچ‌ها و مخمرها می‌باشند. با شروع فرایند تخمیر و نامساعد شدن شرایط برای رشد، به دلایل مختلف از جمله تولید اسید و یا مواد مهارکننده، رشد اکثر آن‌ها مهار می‌گردد. اما میکروارگانیسم‌هایی که به این شرایط حساسیّت کمتری دارند، که اصولا باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها هستند، باقی می‌مانند. این مرحله تخمیر اولیه[6] نامیده می شود. با کاهش اسیدیته در مرحله‌ی بعدی که تخمیر ثانویه[7] نام دارد، باکتری‌های اسید لاکتیک نیز مهار شده امّا مخمّرها همچنان باقی می‌مانند. پس از تخمیر، در تانک‌های سرباز، رشد باکتری‌های اکسیداتیو، مخمرها و کپک‌ها رخ می‌دهد. اما در شرایط بی‌هوازی اگر pH به اندازه‌ی کافی پایین و غلظت نمک بالا باشد این ارگانیسم‌ها قادر به رشد نخواهند بود. در واقع اکولوژی میکروبی به نوع فرایندهایی که طی دوره‌ی تخمیر رخ می‌دهد بستگی دارد. به همین دلیل است که وقتی یک تخمیر گیاهی خودبخودی تکرار می‌گردد یافته‌های دقیقاً یکسان و ثابتی به دست نمی‌آید [۲۸ و ۲۹]. وسیعی و همکاران (۲۰۱٤) اقدام به شناسایی فلور لاکتیکی ماده غذایی ترخینه و بررسی خاصیت پروبیوتیکی آن‌ها نمودند. نتایج حاصل بیانگر خواص بالای پروبیوتیکی سویه‌های متعلق به گونه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *فرمنتوم* داشت. همچنین استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر کشت در شناسایی و افتراق باکتری‌های اسید لاکتیک پیشنهاد شد [۳۰]. همان طور که امروزه به روشنی می‌دانیم شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک که صرفاً بر پایه‌ی آزمایش‌های بیوشیمیایی استوار باشد با مشکلات زیادی همراه است و ممکن است باعث تشخیص اشتباه شود، برای مثال شناسایی *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *لاکتیس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* بر اساس ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی کار دشواری است، زیرا این باکتری‌ها در بسیاری از ویژگی‌ها مشترک هستند [۳۱]. همچنین نتایج آزمایش‌های فنوتیپی برای جنس‌های لوکونوستوک و ویسلا عمدتاً جواب‌های مبهم و غیر قابل استنادی را ارایه می دهد، چرا که هر دوی این جنس‌ها هتروفرمنتاتیو بوده و الگوی تخمیر مشابه دارند [۳۲].

٤- نتیجه‌گیری

شناسایی سویه‌های متنوع و مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک در کیمچی می‌تواند بیانگر خصوصیات تغذیه‌ای بسیار مناسب این ماده غذایی باشد. در این پژوهش، روش‌های سنتی و بیوشیمیایی و همچنین توالی یابی 16S rRNA برای شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک استفاده شد. طبق نتایج به دست آمده مشاهده می‌شود هر روش مزایا و معایب خاص خود را داراست. روش‌های شناسایی سنتی مبتنی بر خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی وقت‌گیر و نه چندان دقیق و موثق می‌باشند. همینطور، توالی‌یابی 16S rRNA اگر چه سریع و قابل اعتماد می‌باشد اما ممکن است نتایج حاصل از این روش گیج کننده باشند که علت آن، اطلاعات وسیع مربوط به توالی‌یابی در بانک اطلاعاتی NCBI می‌باشد. بنابراین، استفاده از روش‌های پلی-فازیک برای شناسایی هر سویه ضروری به نظر می‌رسد که در این پژوهش از روش پلی فازیک استفاده شد. نتایج این پژوهش می‌تواند سرفصلی برای آزمایشات دیگر بر روی این باکتری‌های مفید واقع گردد: از جمله بررسی خصوصیات پروبیوتیکی و تکنولوژیکی سویه‌ها، شناسایی ایزوله‌ها با روش-های غیرمبتنی بر کشت مولکولی و مقایسه با نتایج حاصل از این پژوهش، بررسی خصوصیات ضدباکتریایی، بررسی ویژگی‌های پروتئولیتیک و لیپولیتیک سویه‌های ایزوله شده از کیمچی.

6. Primary fermentation
7. Secondary fermentation

Archive of SID
www.SID.ir

٥- تشکر و قدردانی

مقاله علمی ـ پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ٢/٢٠١٨٩ مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت‌های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

٦- منابع

[1] Tabatabaei Yazdi F, Mohebbi M, Mortazavi SA, Alizadeh Behbahani B, Ghaitaranpour A, Jouki M. 2012. Isolation, identification and comparison of lactic acid bacteria from fermented be produced in Iran Kimchi with Korean commercial samples: introduction of a probiotic product. Scientific Journal of Biological Sciences. 1(6): 120-125.

[2] Moraes P M, Perin L M, Júnior A S and Nero L A. 2013. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. Brazilian Journal of Microbiology 44(1) 109-112.

[3] Chakrabarti P, Das B K andKapil A. 2009. Application of 16S rDNA based seminested PCR for diagnosis of acute bacterial meningitis. Indian Journal of Medical Research 129 (2) 182.

[4] Choi H. J, Cheigh C. I, Kim S. B, Lee J. C, Lee D. W, Choi S. W, Park J. M, and Pyun Y. R. 2002. Weissella kimchii sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 507-511.

[5] Lee J. S, Lee K. C, Ahn J. S, Mheen T. I, Pyun Y. R, and Park Y. H. 2002. Weissella koreensis sp. nov., isolated from kimchi. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 1257-1261.

[6] Lee J. S, Heo G. Y, Lee J. W, Oh Y. J, Park J. A, Park Y. H, Pyun Y. R, and Ahn J.S. 2005. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. International Journal of Food Microbiology. 102: 143-150.

[7] Kim M, and Chun, J. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRANA gene analysis. International Journal of Food Microbiology. 103: 91-96.

[8] Jin-Gyu, Park, Jae-Hun, Kim, Jae-Nam, Park, Young-Duk, Kim, Wang-Geun, Kim, Ju-Woon, Lee, Han-Joon, Hwang, Myung-Woo, Byun. 2008. The effect of irradiation temperature on the quality improvement of Kimchi, Korean fermented vegetables, for its shelf stability. Radiation Physics and Chemistry. 77, 497–502.

[9] Sengun I.Y, Nielsen D.S, Karapinar M, Jakobsen M. 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. International Journal of Food Microbiology 135(2), 105-111.

[10] Edalatian MR, Habibi Najafi MB, Mortazavi A, Alegría Á, Nassiri MR, Bassami MR, Mayo B. 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.

[11] Daeschel, M. Anderson R. E, and Fleming H. P. 1987.Microbial ecology of fermenting plant material. Federation of European Microbiological Societies. 46: 357-367.

[12] Fitzsimons, N.A, Cogan, T.M, Condon, S, Beresford, T., 1999. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. Applied and Environmental Microbiology. 65: 3418 - 3426.

[13] Alegría, A., Álvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S., Mayo, B., 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. International Journal of Food Microbiology 136, 44–51.

[14] Platero, A., Maqueda, M. Valdivida, E., and Purswani, J. 2009. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats milk cheeses from Sierra de Aracena. Food Microbiology, 26: 294-304.

Archive of SID

www.SID.ir

[15] Taheri, H.R., Moravej, H., Tabandeh, F., Zaghari, M.,and Shivazad, M., 2009. Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. Poultry Science, 88(8):1586-1593.

[16] Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. In: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Salminen, S., Wright, A.V.,Ouwehand, A. (Eds.), Marcel Dekker. New York. pp 19-86.

[17] Patil, M. M., Pal, A., Anad, T., and Ramana, K. V. 2010. Isolation and characterization Lactic Acid Bacteria from curd and cucumber. Indian Journal of Biotechnology, 9: 166-172.

[18] Schleifer, K. H.2009. Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978. In: Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology. Volume Three. (2nd edition), Vos, D. P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., and Whitman, W. B., (Eds), Springer Dordrecht Heidelberg. New York. pp 464-654.

[19] Tamang, J. P., Tamang, B., Schillinger, U., Franz, C. M. A. P., Gores, M., and Holzapfel, W.H. 2005. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. International Journal of Food Microbiology, 105: 347-356.

[20] Stiles, E. M.,andHolzapfel, H. W. 1997. Lactic acid and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36:1-29.

[21] Bjorkroth, K. J., Schillinger, U., Geisen, R.,Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel,W.H.,Korkeala, H., and Vandamme, P., 2002. Taxonomic study of Weissella confusa anddescription of Weissella cibaria sp. nov., detected in food and clinical samples.International Journal ofSystematic and Evolutionary Microbiology, 52(1):141-148.

[22] De Vuyst, L., Schrijvers, V., Paramithiotis, S., Hoste, B., Vancanneyt,M., Swings, J., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., and Messens,W., 2002. The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. Applied and Environmental Microbiology, 68: 6059-6069.

[23] Kostinek, M., Specht, I., Edward,V. A., Schillinger, U., Hertel, C., Holzapfel,W.H., and Franz, C.M., 2005. Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. Systematic and Applied Microbiology, 28: 527-540.

[24] Emerenini, E. C., Afolabi, O. R., Okolie, P. I., and Akintokun, A. K. 2013. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria Isolated from fresh fruits and vegetables using nested PCR analysis. British Microbiology Research Journal, 3(3): 368-377.

[25] Sanchez, I., Sesenab, S., Poveda, J., and Cabezasa, L. 2006. Genetic diversity, dynamics and activity of Lactobacillus community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. International Journal of Food Microbiology, 107(3): 265-273.

[26] Cho, J., Lee, D., Yang, C., Jeon, J., Kim, J., and Han, H. 2006. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product. FEMS Microbiology Letters, 257: 262-267.

[27] Kim, M., and Chun, J. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRANA gene analysis. International Journal of Food Microbiology, 103: 91-96.

[28] Bamforth, W. CH.2005.FoodFermentation and Microorganisms. Blackwell Publishing company. London. pp 103-142.

[29] Hutkins, W. R. 2001. Metabolism of Starter Cultures. In:Applied Dairy Microbiology. Marth, H. M., and Steele L. J. (Eds), Marsel Dekker. New York. pp 327-330.

[30] Vasiee, AR, Tabatabaei-Yazdi F, Mortazavi A, Edalatian MR. 2014. Isolation, Identification and Characterization of Probiotic Lactobacillus spp. from Tarkhineh. International Food Research Journal. In Press.

Archive of SID

www.SID.ir

[31] Giraffa.G., Andrighetto, C., and Antonella, C. 2004. Genotyping and phenotypic diversity of lactobacillus dalbrueckii. International Journal of food Microbiology, 91: 129-139.

[32] Schillinger, U., Boehringer, B., Wallbaum, S., Caroline, L., Gonfa, A., Huch, M., Holzapfel, w. H., and Franz, C. M. A. P. 2008. A genus-specic PCR method for diferentiation between Leuconostoc andWeissella and its application in identication of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation. FEMS Microbiology Letters, 286: 222–226.

Archive of SID

www.SID.ir

Isolation and Identification of Lactic Microbiota from Kimchi, produced in Iran, based on Biochemical and Molecular Methods

Tabatabaei Yazdi, F.[1] *, Vasiee, A. R. [2], Alizadeh Behbahani, B. [2]

1. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Ph.D Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 93/5/17 Accepted: 93/7/1)

Kimchi is a general term for fermented vegetables.The aim of this study was to isolate and identify the Lactic Acid Bacteria involved in spontaneous fermentation of this product used biochemical and molecular methods. In this study, after successive culture on specific media, in order to classify of 85 selected isolates that according to preliminary experiments seemed Lactic Acid Bacteria, physiological and biochemical tests were done and then fermentation of 10 different carbohydrates were performed. Based on these tests, 85 isolates were divided into 10 groups. Some isolates were selected from each group and 16S rRNA was amplified using universal primers. Diversity of lactic acid bacteria in Kimichi was as followings: *Lactobacillus plantarum* (41.17%), *Lactobacillus fermentum* (9.41%), *Enterococcus faecalis* (3.52%), *Enterococcus faecium* (7.06%), *Leuconostoc citreum* (2.35%), *Leuconostoc mesenteroides (3.52%), Pediococcus pentosaceus* (8.23%), *Wisella cibaria* (24.70%). This fermented product has a wide microbial diversity which originates from natural microbiota presented in the raw vegetable. Lactic acid bacteria can produce a variety of acids and enzymes which play an important role in development of unique flavor and tasteTherefore, this strains that isolated from Kimchi can be used in the food industry.

Key words: Kimchi, Lactic flora, Biochemical tests, 16S rRNA

* Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir