

جداسازی و شناسایی باکتریهای اسید لاکتیک دوغ شیر شتر تک کوهانه ایرانی و بررسی خواص تکنولوژیکی آنها

نفیسه دعوتی^{۱*}، سعید زیبائی^۲

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی بهار، دانشگاه بوعلی سینا همدان

۲- دانشیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی واحد شمال شرق

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۰۳)

چکیده

شیر شتر دارای فواید سلامتی و خواص شفا بخش است و باکتری‌های اسید لاکتیک نقش مهمی در کیفیت محصولات تخمیری شیر شتر نظیر دوغ بازی می‌کنند. ۳ نمونه از دوغ شیر شتر تک کوهانه ایرانی (*Camelus dromedarius*) تحت شرایط اسپتیک از استان گلستان جمع‌آوری شد. ۳۲ باکتری توسط کشت نمونه بر روی محیط کشت MRS آگار جدا شدند. در میان باکتری‌های جدا شده، از نظر فنوتیپی تنها ۴ جدایه متفاوت شامل لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس فریتوشنسسیز، پدیوکوکوس پنتوسازئوس و انتروکوکوس فسیوم شناسایی شدند. جدایه‌های باکتریایی توسط تکثیر ژن ۱۶S rRNA به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و آنالیز محدود DNA ریبوزومی تکثیر شده (ARDRA) توسط هضم با آنزیم *Hae III* گروه بندی شدند. اما براساس آنالیز محدود ژن ۱۶S rRNA، جدایه‌های لاکتیکی درون ۵ پروفایل بانندی متفاوت گروه بندی شدند که توسط توالی‌یابی به عنوان لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوس پنتوسوس، پدیوکوکوس پنتوسازئوس و انتروکوکوس لاکتیس شناسایی شدند. ارزیابی فعالیت اتولیتیکی، لیپولیتیکی و تولید اسید جدایه‌ها نشان داد که پتانسیل تکنولوژیکی جدایه‌های دوغ شیر شتر ایرانی قابل توجه می‌باشد.

کلید واژگان: شتر، دوغ، باکتری‌های اسید لاکتیک، خواص تکنولوژیکی.

* مسئول مکاتبات: n.davati@basu.ac.ir

۱- مقدمه

مطالعات دیگری بر روی شناسایی فلور میکروبی فرآورده‌های لبنی سنتی ایران انجام شده است نظیر شناسایی و تعیین هویت فلور لاکتیکی پنیرهای حاصل از شیر خام (لیقوان و کوزه) با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت و روش‌های مولکولی با استفاده از تکنیک PCR-DGGE وجداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌هایی با پتانسیل پروبیوتیکی از فرآورده‌های لبنی سنتی (ماست و پنیر) مناطق هریس و سراب [۴]. عدالتیان و همکاران در مطالعه خود توانستند باکتری‌های زیر را از پنیرهای لیقوان و کوزه جدا کنند:

Lactococcus lactis subsp. *lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Lactobacillus fructivorans*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* (۲).

در گذشته شناسایی فلور میکروبی موجود در مواد غذایی تخمیری، توسط تکنیک‌های کلاسیک وابسته به کشت انجام گرفته و در حال حاضر به وسیله روش‌های مولکولی وابسته و مستقل از کشت^۱ که مکمل تکنیک‌های کشت کلاسیک هستند انجام می‌شود. این روش‌ها و تکنیک‌ها، تصویر کامل‌تری از تعداد، نوع و دینامیک ریزسازواره‌ها فراهم می‌کنند. هدف از این مطالعه جداسازی فلور لاکتیکی مسئول تخمیر شیر شتر و تولید دوغ، شناسایی فنوتیپی و مولکولی آن به روش ARDRA می-باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جداسازی و شناسایی فنوتیپی گونه‌های

لاکتیکی دوغ شتر

سه نمونه دوغ شیر شتر از استان گلستان تحت شرایط سترون جمع‌آوری شد و تا رقت مناسب رقیق‌سازی گردید و بر روی محیط MRS آگار (مرک، آلمان) کشت شد. پلپت‌ها در ۲۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط بی-هوازی به وسیله گازپک نوع A (مرک، آلمان) گرمخانه‌گذاری

شتر یکی از حیوانات مقاوم به مناطق خشک و بیابانی می‌باشد. و نتایج مطالعات علمی نشان داده است که شیر این حیوان دارای ارزش غذایی و خواص سلامتی بخش زیادی می‌باشد. ایران دارای مناطق بیابانی زیادی است که شتر یکی از حیوانات بومی این بیابان‌های وسیع می‌باشد. در ایران شیر شتر به صورت تازه یا به صورت تخمیری و به شکل دوغ مصرف می‌شود. در محصولات تخمیری شیر شتر، باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان آغازگر نقش مهمی در فرایند تخمیر بازی می‌کنند [۱] و یکی از مهمترین ارگانیزم‌های پروبیوتیک می‌باشند. فعالیت‌های متابولیکی آن‌ها منجر به تولید مواد فرار موثر در توسعه طعم، آروما و بافت شده و با تولید متابولیت‌های مختلف باعث افزایش زمان ماندگاری فرآورده‌های لبنی می‌شوند. برخی از سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک مانتول تولید می‌کنند که اثرات تحریک کنندگی بر سلامت انسان دارند [۲]. از دیر باز باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان مهمترین عامل رسیدن فرآورده‌های لبنی، اسیدیفیکاسیون، ایجاد بافت، عطر و طعم در این فرآورده‌ها شناسایی شده‌اند و باکتری‌های ذاتی هر محصول نقش اصلی را در این زمینه بازی می‌کنند. اکثر فرآورده‌های لبنی تخمیری بومی هر منطقه دارای فلور میکروبی ویژه منحصر به خود می‌باشند و همین تفاوت‌ها باعث ایجاد تنوع در رایحه و طعم ویژه در فرآورده‌های مختلف می‌شود البته عوامل دیگری از جمله نوع ماده اولیه، افزودنی‌ها، همچنین نحوه فرایند نیز بر خصوصیات ویژه محصول تاثیرگذار هستند. بنابراین برای حفظ خواص سنتی و ویژگی‌های ارگانولپتیکی فرآورده‌های لبنی تخمیری باید سویه‌های خاص باکتری‌های اسید لاکتیک ذاتی فرآورده‌های بومی هر منطقه جداسازی، شناسایی و گروه بندی شوند و قابلیت‌های عملکردی آن مورد ارزیابی قرار گیرند. در مطالعه‌ای که اعتمادی فر و همکاران در شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک شیر شتر استان گلستان انجام دادند موفق شدند ۵۶ جدایه انتروکوکوس با گونه-های فسیوم، فکالیس، دورانس و رافینوسوس و ۱۸ جدایه لاکتوباسیلوس با گونه‌های فرمتوم و پلاتناروم را جداسازی کنند. در این مطالعه سهم *Enterococcus faecium* و *Lactobacillus fermentum* بیشترین بود [۳]. همچنین

1. Culture- independent

۲-۲- شناسایی مولکولی جدایه‌ها

۱-۲-۲- استخراج DNA

جهت استخراج DNA، تک کلنی در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونایز استریل تعلیق‌سازی شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از الکل ایزوآمیل/کلروفرم (۲۴/۱) به سوسپانسیون اضافه گردید. نمونه در ۱۶۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در ۴ °C سانتریفوژ گردید. سپس ۲ میکرولیتر از محلول فاز آبی به عنوان منبع نمونه DNA برای واکنش PCR استفاده شد [۸].

۲-۲-۲- انجام عملیات PCR و تکثیر ناحیه ژن S

۱۶rRNA

پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های 16S rDNA شامل B27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و U1492R (5'-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3') (Bioneer, Korea) بودند. واکنش PCR به وسیله مخلوط کردن ۲ μl از DNA الگو، ۱۶ μl آب دیونیزه استریل فاقد آنزیم DNase (سیناکلون، ایران)، ۱ μl از هر یک از پرایمرهای B27F و U1492R (با غلظت ۱۰ picomole / μl) با کیت خشک 2X PCR Master (بایورون، آلمان) به وسیله دستگاه ترموسایکلر با پروفایل برنامه دمایی زیر انجام گردید. مرحله فعال سازی^۱ در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، سیکل مراحل واسرشته‌سازی^۲ در ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال^۳ در ۵۰ °C به مدت ۴۵ ثانیه، توسعه^۴ در ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه، و در نهایت مرحله توسعه نهایی^۵ در ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه و سرد کردن در ۴ °C به مدت ۵ دقیقه [۹].

۲-۲-۳- آنالیز محدود DNA ریپوزومی تکثیر شده

(ARDRA)

جهت هضم آنزیمی به ۱۰ μl محصول PCR ژن 16S rRNA از هر یک از جدایه‌ها ۱ μl از آنزیم محدودکننده مورد نظر (*Hae* III (RE^۷) (فرمتاز، کانادا) و ۲ μl بافر آنزیم مربوطه

گردیدند. سپس کلنی‌ها توسط کشت خطی بر روی محیط MRS آگار خالص‌سازی شدند. تست کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی برای غربال‌گری اولیه جدایه‌ها انجام شد. سویه‌های جدا شده از لحاظ تولید گاز، تحمل کلرید سدیم ۶.۵٪ و ۱.۸٪، رشد در ۱۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، pH ۹.۶ و ۴.۴، در سطح جنس شناسایی گردیدند (۵). در جنس پدیوکوکوس، شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها در سطح گونه براساس خواص فنوتیپی جدایه‌ها به وسیله رشد در دماهای مختلف (۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۴۸ درجه سانتی‌گراد)، در pH ۷، pH ۸، pH ۹ و pH ۴.۵، بیشترین درصد کلرید سدیم (حجمی/وزنی) مورد تحمل برای رشد علاوه بر قابلیت تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف انجام گردید. تخمیر کربوهیدرات‌ها در محیط آبی MRS بدون گلوکز با بروموکروزول پورپل ۰.۰۴ گرم در لیتر به عنوان شاخص pH، با افزودن کربوهیدرات‌های مختلف به میزان ۱٪ (حجمی/وزنی)، هیدرولیز اسکولین و تولید آمونیوم از آرژنین ارزیابی شدند [۴ و ۳]. جدایه‌های تایید شده از مرحله قبل در جنس انتروکوکوس براساس پروفایل تخمیر کربوهیدرات‌ها (ان-استیل‌گلوکز آمین، دی-آرابینوز، ال-آرابیتول، سلوبیوز، دولسیتول، دی-فروکتوز، گالاکتوز، بتا-جینتوبیوز، گلوکونات، دی-گلوکز، گلیسرول، گلیکوژن، اینوزیتول، ۲-کتوگلوکونات، لاکتوز، مالتوز، مانیتول، دی-مانوز، ملیبیوز، دی-رافینوز، رامنوز، سوربیتول، نشاسته، ساکروز، تری‌هالوز، گزلیتول، دی-گزیلوز، ال-گزیلوز دی-آرابیتول، اینولین، ملی‌زیتوز، ریبوز، ال-سوربوز)، تولید استوئین، هیدرولیز اسکولین و نشاسته تا سطح گونه مورد شناسایی قرار گرفتند [۶]. همچنین جدایه‌های تایید شده در جنس لاکتوباسیلوس، براساس پروفایل تخمیر کربوهیدرات‌ها (آرابینوز، سلوبیوز، گالاکتوز، گلوکونات، لاکتوز، مالتوز، مانیتول، دی-مانوز، ملیبیوز، رافینوز، سالیسین، سوربیتول، ساکروز، تری-هالوز، گزیلوز، ملی‌زیتوز، ریبوز، اسکولین) و تولید NH₃ از آرژنین تا سطح گونه مورد شناسایی قرار گرفتند [۷]. نتایج بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۰ °C ثبت شد [۶].

1. Bioron
2. Activation
3. Denaturation
4. Annealing
5. Extension
6. Final extension
7. Restriction enzyme
8. Fermentas

درصد جذب در OD_{750} نانومتر بر اساس معادله ۱ اندازه گیری شد [۱۰].

$$A_0 = (A_0 - A_t) \times 100 / A_0 = \text{جذب اولیه}$$

$A_t = \text{جذب اندازه گیری شده بعد از } t \text{ زمان گرمخانه گذاری شده}$

با توجه به این معادله، جدایه‌ها از نظر اتولیز شدن براساس معیار تشریح شده آید و همکارانش که در بخش نتایج و بحث به آن اشاره می‌گردد درجه‌بندی شدند [۱۱-۱۳].

۲-۳-۳-۲-۳-۳-۲ ارزیابی کمی فعالیت لیپولیتیکی

جدایه‌ها در MRS براث به مدت ۲۴ ساعت در 37°C کشت گردیدند. سپس کشت حاصل در ۸۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی برای ارزیابی کمی فعالیت لیپولیتیکی انتخاب گردید [۱۴]. فعالیت آنزیم لپاز طبق روش یامادا و همکارانش^۳ به صورت زیر اندازه‌گیری شد: ۱ میلی لیتر محلول آنزیمی به ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۰٫۲ مولار با $\text{pH} = 7$ و ۱ میلی لیتر محلول کلرید کلسیم ۰٫۱ مولار اضافه گردید. سپس ۵ میلی لیتر از امولسیون سوبسترا (روغن زیتون و پلی‌وینیل الکل با نسبت حجمی ۳/۱) به آن اضافه شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، برای خاتمه واکنش ۲۰ میلی لیتر مخلوط هم حجم استن- اتانول به آن اضافه گردید تا امولسیون شکسته گردد. سپس ۳ قطره فنل فتالین ۱٪ به آن افزوده و با سود ۰٫۰۵ نرمال تیترا گردید. حجم سود مصرفی جهت تیترا را V_1 فرض کردیم. برای محلول شاهد، کلیه مراحل فوق به غیر از افزودن محلول آنزیمی انجام شد. حجم سود مصرفی در تیتراسیون شاهد را V_2 فرض کردیم. واحد فعالیت لپاز (LU)، مقدار فعالیت آنزیمی است که یک میکرومول اسید چرب را در مدت ۱ دقیقه در شرایط دمای 37°C و بافر فسفات با $\text{pH} = 7$ ، از سوبسترا آزاد نماید. طبق معادله ۲ فعالیت آنزیم در هر میلی لیتر محاسبه گردید [۱۵].

$$U = \frac{N \times (V_1 - V_2) \times 1000}{t}$$

[Unit/ml] فعالیت لیپولیتیکی = U؛ نرمالته سود مصرفی جهت

تیتراسیون = N؛ $V = V_1 - V_2$ ؛ مدت آزمایش = t.

اضافه شد. پس از مخلوط کردن هریک از محلول‌های حاوی آنزیم در حمام بن ماری 37°C به مدت ۱/۵ ساعت قرار داده شد تا هضم انجام گردد. قطعات DNA به وسیله الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ و ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۹۰ دقیقه جدا شدند (۹).

۲-۳-۲-۳-۲-۳-۲ بررسی فعالیت تکنولوژیکی جدایه‌ها

۲-۳-۲-۱-۳-۲ ارزیابی قابلیت تولید اسید

۲-۳-۲-۱-۳-۲-۱-۳-۲ روش پتانسیومتریک (اندازه‌گیری pH): جدایه‌ها به طور اولیه در MRS براث فعال‌سازی گردیدند و سپس به میزان ۱٪ در شیر اسکیم بازسازی شده به همراه عصاره مخمر ۰٫۳٪ و گلوکز ۰٫۲٪ کشت داده شدند و در طی گرمخانه‌گذاری در دمای 30°C تغییرات pH به وسیله pH متر با الکتروود شیشه‌ای (لبترون^۱ PHT-110، ایران) اندازه‌گیری شد [۹].

۲-۳-۲-۱-۳-۲-۲ روش تیتراسیون: به دو میلی لیتر از نمونه، ۱ تا ۲ قطره فنل فتالین ۱٪ به عنوان شاخص اضافه گردید. سپس نمونه‌ها با سود ۰٫۱ N تیترا شدند. زمانی که اولین تغییر رنگ جزئی به صورتی ظاهر شد پایان تیتراسیون ثبت شد. هر ۱ میلی-لیتر سود ۰٫۱ N مصرفی معادل ۹٫۰۰۸ mg میلی‌گرم اسید لاکتیک است. سرانجام نتایج به صورت میلی‌گرم در میلی لیتر بیان شدند [۹]. براساس نتایج حاصل از پتانسیومتریک (اندازه‌گیری pH) و تیتراسیون، نمودار میله‌ای تغییرات pH و منحنی مقدار اسید لاکتیک تولید شده برحسب میلی‌گرم در میلی لیتر در مقابل زمان توسط برنامه مایکروسافت اکسل^۲ رسم گردید.

۲-۳-۲-۲-۳-۲ ارزیابی فعالیت اتولیتیکی

پلت سلولی از کشت شبانه (۱۶ ساعته) توسط سانتریفوژ در ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در 4°C جمع‌آوری شد و در بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 5,5$ حاوی ۱ مولار کلرید سدیم تعلیق سازی شده و تا OD_{720} معادل ۱ رقیق سازی گردید. سوسپانسیون سلولی در معرض یک سیکل انجماد (37°C -۲۰، ۲۴ ساعت) و خروج از انجماد قرار گرفته سپس در 37°C گرمخانه‌گذاری شد. میزان فعالیت اتولیتیکی به صورت کاهش

3. Yamada

1. Labtron
2. Microsoft Excell

۳- نتایج

پدیوکوکوس پتوسازئوس و انتروکوکوس فسیوم شناسایی شدند که نتایج این شناسایی فنوتیپی در سطح گونه به ترتیب برای جنس‌های لاکتوباسیلوس، پدیوکوکوس و انتروکوکوس در جداول ۲، ۱ و ۳ مشخص شده است. جدایه‌های باکتریایی توسط تکثیر ژن rRNA ۱۶S به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) و آنالیز محدود DNA ریبوزومی تکثیر شده (ARDRA) توسط هضم با آنزیم *Hae III* گروه بندی شدند.

۳۲ باکتری توسط کشت نمونه دوغ شیر شتر بر روی محیط کشت MRS آگار جدا شدند. براساس نتایج شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها در ۳ جنس پدیوکوکوس، لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس شناسایی شدند. جدایه‌های شناسایی شده در سطح این ۳ جنس، به لحاظ خصوصیات فنوتیپی در ۴ گونه متفاوت شامل لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس فریتوشنسز،

Table 1 Phenotypic characteristics differentiating *lactobacillus* species

Identified isolates	Group C (Obligate heterofermentative)	
	<i>Lb. Brevis</i>	<i>Lb. Ferintoshensis</i>
Isolate No	7,9,10, 11,13,16,17,24	5,6, 22, 29,32
Growth at:		
15/45 (°C)	+/-	+/-
6.5% NaCl	+	+
18% NaCl	-	-
pH=4.4	-	-
pH=9.6	-	-
CO ₂ production from glucose	+	+
Acid from:		
Galactose	+	+
Lactose		
Maltose	+	+
Mannitol		
D-Mannose	-	+
Melibiose	+	+
D-Raffinose	+	+
Salicin		
Sucrose	+	+
Trehalose	-	+
Arabinose	+	+
Aesculin	+	+
Melezitose	-	+
Ribose	+	+
Sorbitol		
Xylose	+	+
NH ₃ production from arginine	+	+

+, 90% or more strains positive; -, 90% or more strains negative; d, 11-89% of strains positive

Table 2 Phenotypic characteristics differentiating *Pediococcus* species

Identified isolates	<i>P. pentosaceus</i>
Isolate No	1,4,8,26,30,14
Growth at:	
pH 4.5	+
pH 7.0	+
pH 8.0	+
pH 9.0	-
35°C	+
40°C	d
45°C	d
48°C	-
Acid from:	
Arabinose	+
Galactose	+
Lactose	+
Maltose	+
Melibiose	-
Ribose	+
Xylose	d
Max. NaCl conc. For growth	10

+, 90% or more strains positive; -, 90% or more strains negative; d, 11–89% of strains positive

Table 3 Phenotypic characteristics differentiating *Enterococcus* species

Identified isolates	<i>E. faecium</i>
Isolate No	2,3,12,15,18,19,20,21,23,25,27,28,31
Growth at:	
10 °C	+
45 °C	+
6.5% NaCl	+
Acid from:	
Inulin	-
Aesculin and Ribose	+
Melezitose	-
Sorbose	-
Arabinose	-
Cellobiose and Fructose	+
Dulcitol	-
Fucose	-
Galactose and Glucose	+
Glycerol and Mannitol	D
Inositol	-
Lactose and Maltose	+
D-Mannose	+
Melibiose and D-Raffinose	D
Rhamnose and Sorbitol	D
Saccharose	D
Trehalose	+
Xylose	-

+, 90% or more strains positive; -, 90% or more strains negative; d, 11–89% of strains positive

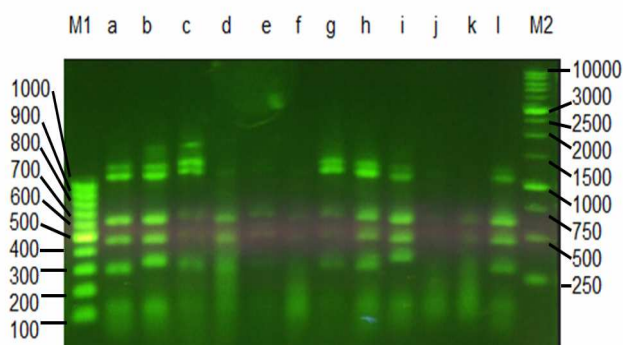


Fig 1 Amplified 16S rDNA Restriction Analysis (ARDRA) Profiles With HaeIII
M₂: 1000 bp marker **M₁**: 100bp marker
a: *Lactobacillus brevis* **b:** *Lactobacillus fermentum*. **c:** *Lactobacillus pentosus* **d:** *Pediococcus pentosaceus*
e: *Pediococcus pentosaceus* **f:** *Enterococcus lactis* **g:** *Lactobacillus brevis* **h:** *Lactobacillus brevis* **i:** *Pediococcus pentosaceus* **j:** *Enterococcus lactis* **k:** *Enterococcus lactis* **l:** *Pediococcus pentosaceus*

براساس آنالیز محدود ژن ۱۶S rRNA توسط این آنزیم جدایه‌های لاکتیکی درون ۵ پروفایل باندی متفاوت گروه بندی شدند (شکل ۱). نتایج توالی‌یابی یک نماینده از هر پروفایل باندی که توسط شرکت ماکروژن کره با همولوژی ۹۸-۹۹٪ انجام گردید نشان داد که این جدایه‌ها متعلق به گونه‌های لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوس پنتوسوس، پدیوکوس پنتوسازئوس و اتروکوکوس لاکتیس می‌باشند (جدول ۴).

ارزیابی شدت اتولیز شدن باکتری‌های اسید لاکتیک براساس درصد کاهش جذب طی اتولیز شدن که توسط آیاد و همکارانش تشریح شده به صورت زیر درجه‌بندی می‌شوند [۱۱-۱۳].
 اتروکوکوس‌ها: خوب=۳۵-۶۶، نسبتاً خوب=۲۴-۳۴ و ضعیف=۰-۲۲

Table 4 Results of identified isolates based on 16S rDNA sequencing

Isolate No	%Identity	Closest Relative
2,3 , 12, 15, 18, 19, 20, 21, 23, 25, 27, 28, 31	98	<i>Enterococcus lactis</i>
5,6, 29,32	99	<i>Lactobacillus fermentum</i>
1,4,8,26,30,14	98	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
11,13,16,17,24	99	<i>Lactobacillus brevis</i>
7,9,10,22	98	<i>Lactobacillus pentosus</i>

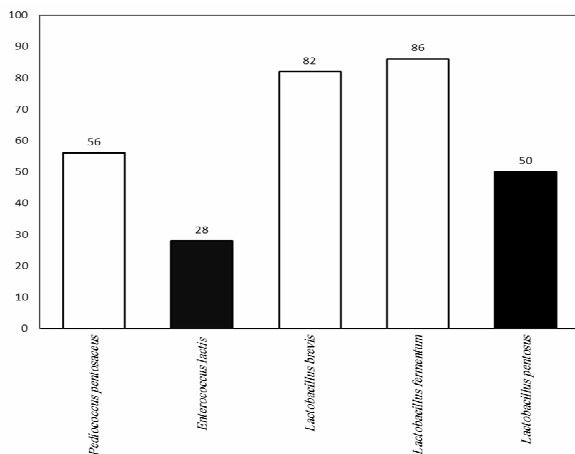


Fig 2 Autolytic activity of isolates based on absorbance reduction at 650 nm during 24 hours incubation.
 fairly (black) good (white)

لاکتوباسیل‌ها: خوب=۷۰-۹۶، نسبتاً خوب=۴۰-۶۹ و ضعیف=۰-۳۹
 فعالیت اتولیتیکی جدایه‌های لاکتیکی دوغ شیر شتر در طی ۴۸ ساعت به صورت کاهش درصد جذب در طول موج ۶۵۰ نانومتر به صورت نمودار میله‌ای در شکل ۲ نشان داده می‌شود. بر اساس درجه بندی بالا و نمودار شکل ۲ جدایه‌های لاکتیکی شیر شتر از نظر فعالیت اتولیتیکی به صورت زیر گروه‌بندی می‌شوند:
 - در سطح خوب: پدیوکوکوس پنتوسازئوس، لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس برویس.
 - در سطح نسبتاً خوب: اتروکوکوس لاکتیس و لاکتوباسیلوس پنتوسوس

برخوردار بودند و در بین لاکتوباسیلوسها به ترتیب گونه‌های لاکتوباسیلوس فرمنتوم، پنتوسوز و برویس دارای بیشترین فعالیت لیپولیتیکی می‌باشند.

همچنین بر اساس نتایج بررسی فعالیت لیپولیتیکی این جدایه‌ها که در جدول ۵ نشان داده می‌شود، لاکتوباسیلوسها نسبت به سایر جنس‌های دیگر دوغ شیر شتر از فعالیت لیپولیتیکی خوبی

Table 5 Lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from drinking Yogurt of camel milk

Isolates	Lipolytic activity (Unit/ml)
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	6,25±0.41
<i>Enterococcus lactis</i>	8.00±0.03
<i>Lactobacillus pentosus</i>	9.34±0.8
<i>Lactobacillus brevis</i>	9.13±0.26
<i>Lactobacillus fermentum</i>	12.34±0.48

یک جدایه مناسب در تخمیر باید بتواند در دمای ۳۰°C در طی ۶ ساعت از کشت $pH=5.0 \pm 0.2$ حاصل کند و یک باکتری تولید کننده سریع اسید باید به مدت ۳ ساعت از کشت اختلاف pH معادل ۰,۴ واحد ($\Delta pH=0.4$ U) در دمای ۳۰°C ایجاد کند. بر اساس نمودار شکل ۳ تمام گونه‌های لاکتیکی جدا شده از دوغ شیر شتر قدرت کاهش اسید به میزان ۰,۴ واحد ($\Delta pH=0.4$ U) بعد از ۳ ساعت از کشت را دارا می‌باشند. همچنین نتایج تیتراسیون اسید لاکتیک تولیدی در طی تخمیر با سود ۰,۱ نرمال (شکل ۴) نشان داد که گونه‌های لاکتوباسیلوس فرمنتوم، پدیوکوکوس پنتوسازئوس و انتروکوکوس لاکتیس بیشترین قدرت تولید اسید بر حسب میلی گرم در میلی لیتر اسید لاکتیک در بین سایر گونه‌ها را دارا می‌باشند و از نظر تولید اسید قدرت بالایی دارند.

۴- بحث

در آنالیز مولکولی پرایمرهای انتخاب شده قادر به تکثیر ژن $rDNA$ هر یک از جدایه‌ها بودند. در این مطالعه روش ARDRA، غربالگری، گروه‌بندی و شناسایی ۳۲ جدایه حاصل از دوغ شیر شتر را تسهیل کرد. نتایج شناسایی مولکولی جدایه‌های لاکتیکی بر اساس توالی‌یابی ژن $rDNA$ ۱۶ که در ۵ پروفایل بانندی متفاوت گروه بندی شده بودند حضور ۵ گونه متفاوت لاکتیکی شامل لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوس پنتوسازئوس، پدیوکوکوس پنتوسازئوس و

نتایج کاهش pH و پتانسیل تولید اسید توسط این جدایه‌ها به ترتیب در نمودار شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده می‌شود.

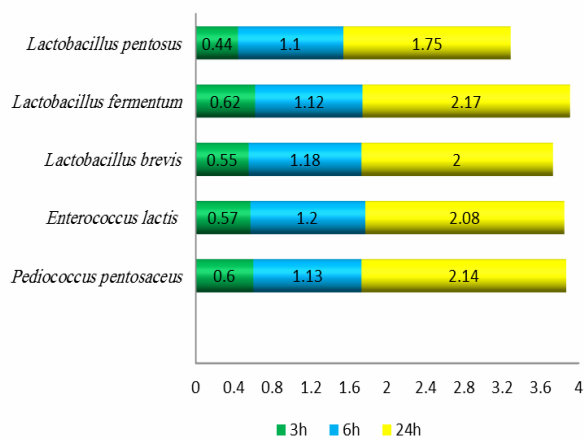


Fig 3 pH changes by isolates during 24 hours incubation

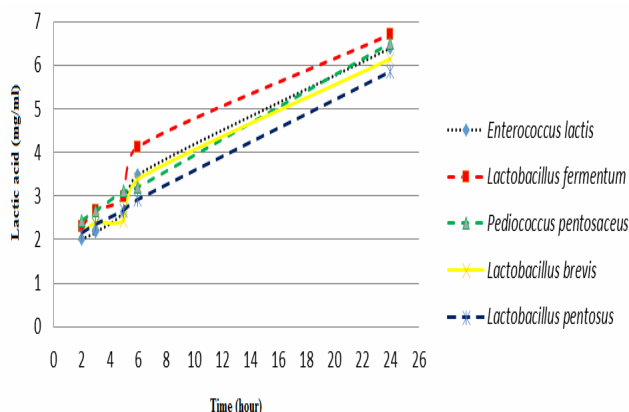


Fig 4 Lactic acid production curve by isolates

کرد: کشت‌هایی با فعالیت اتولیتیکی بالا (۷۳٪ تا ۹۴٪) شامل لاکتوباسیلوس رامنوسوز FAUU110، لاکتوباسیلوس پاراکازئی زیرگونه پاراکازئی FAUU27، با فعالیت متوسط (۴۰٪ تا ۶۹٪) شامل لاکتوباسیلوس رامنوسوز FAAU23 و با فعالیت ضعیف (۴٪ تا ۳۹٪) شامل لاکتوباسیلوس رامنوسوز FAAU141، لاکتوباسیلوس پاراکازئی زیرگونه پاراکازئی FAAU92 و لاکتوباسیلوس پلانتاروم FAAU20 (۱۹). در مطالعه دیگری حاساین فعالیت اتولیتیکی لاکتوباسیلوس رامنوسوز (DN13، DR19، DN14، DN15، DR19)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم (DR20، DN16، DN12، DR9)، انتروکوکوس دورانس (DN3) و انتروکوکوس فسیوم (DT2، DT4، DR6) را در سطح خوب گزارش کرد. که میزان این فعالیت برای لاکتوباسیل‌ها ۷۳٪ تا ۹۲٪ و انتروکوکوس‌ها ۴۰٪ تا ۵۶٪ بود. همچنین برای لاکتوباسیلوس رامنوسوز (DR17)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم (DT18)، لاکتوباسیلوس لاکتیس (DT11) و انتروکوکوس فکالیس (DN1، DR7) سطوح متوسطی از اتولیز گزارش کرد که برای لاکتوباسیلوس بین ۵۷ تا ۵۸٪، لاکتوباسیلوس پاراکازئی زیرگونه پاراکازئی (DT21، DT23)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم (DR22)، لاکتوباسیلوس لاکتیس (DR10) و انتروکوکوس فکالیس (DN5) با شدت اتولیز بین ۱۲ تا ۲۰٪ برای لاکتوباسیلوس، ۹٪ برای لاکتوباسیلوس و ۸٪ برای انتروکوکوس‌ها گزارش شد (۱۰). در این مطالعه مشخص شد که تمام گونه‌های لاکتیک دوغ شیر شتر دارای فعالیت لیپولیتیکی در رنج ۶۱،۲۵± تا ۴۸،۳۴± (واحد فعالیت آنزیم لپاز در میلی-لیتر) می‌باشند. در حالی‌که در بررسی هاله ایجاد شده اطراف کلنی جدایه‌های لاکتیک اومافوبه درباره جدایه‌های جنس‌های لاکتوباسیلوس، لاکتوباسیلوس، لوکونوستوک، استریپتوکوکوس و انتروکوکوس مورد مطالعه خود گزارش کرد تنها ۱۸٪ از گونه‌ها (۲۰) و آکورو درباره جدایه‌های لاکتیک مورد مطالعه خود گزارش کرد تنها ۴۴٪ گونه‌ها فعالیت لیپولیتیکی دارند. همچنین آکورو در ارزیابی کمی فعالیت لیپولیتیکی جدایه‌ها با روش تیتراسیون گزارش کرد که لاکتوباسیلوس کرموریس (۲۰،۰۰±۵،۰۰)، لاکتوباسیلوس فرمنتوم (۱۸،۳۳±۱،۶۷)،

انتروکوکوس لاکتیس را در دوغ شیر شتر شناسایی کرد. اما با توجه به نتایج این مطالعه در غربال‌گری اولیه جامعه لاکتیک دوغ شیر شتر در سطح جنس و گونه، و شناسایی فنوتیپی آن‌ها در بین ۳۲ جدایه لاکتیک، ۴ گونه مختلف لاکتیک شامل لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس فریتوشنسز، پدیوکوکوس پیتوسازئوس و انتروکوکوس فسیوم از نظر فنوتیپی شناسایی شد. در این‌جا تفاوت‌هایی در نتایج شناسایی فنوتیپی و مولکولی مشاهده می‌شود. البته نتایج شناسایی فنوتیپی به دلایل مختلفی از دقت پایین تری نسبت به شناسایی مولکولی برخوردار است. مورانس و همکاران (۲۰۱۳) مطالعه‌ای جهت مقایسه دقت دو روش فنوتیپی شامل سیستم API50CHL و روش بیولوژی (شامل یک پلیت منحصر به فرد جهت تخمیر ۹۶ کربوهیدرات) با دو روش مولکولی توالی‌یابی 16S rDNA و واکنش PCR مخصوص گونه^۱ برای تعدادی باکتری اسید لاکتیک مشخص انجام دادند. در این مطالعه قابلیت اعتماد به دو روش مولکولی مورد استفاده ۱۰۰٪ بود و تست‌های فنوتیپی قابلیت اعتماد پایین‌تری نشان داده بطوری‌که برای دو روش بیولوژی و روش API50CHL به ترتیب ۹۹/۹ - ۷۴ و ۷۸/۲ - ۹۹/۹ گزارش شد. آن‌ها گزارش کردند برای اکثریت باکتری‌های تست شده هیچ گونه تطابق بین نتایج فنوتیپی و مولکولی مشاهده نگردید [۱۶]. روش‌های فنوتیپی دارای محدودیت‌ها و معایبی در شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک هستند نظیر قدرت پایین تمایز [۱۷]، نیازهای تغذیه‌ای مشابه برای رشد، تکرارپذیری ضعیف، عدم بیان برخی ژن‌ها در برخی باکتری‌ها که مرتبط با شرایط محیطی می‌باشد، تغییرپذیری باکتری‌ها در طی رشد و تغییر شکل از حالت کروی به میله‌ای کوتاه و بالعکس [۱۶]. همچنین تخمیر کربوهیدرات‌ها یک واکنش آنزیمی است که تحت تاثیر زمان و دمای گرمخانه-گذاری قرار می‌گیرد [۱۸]. در این مطالعه لاکتوباسیلوس‌ها بر اساس معیار تشریح شده توسط آیاد و همکارانش از فعالیت اتولیتیکی خوبی برخوردار بودند، مشابه این ارزیابی و نتایج در مطالعات دیگر دانشمندان بر روی باکتری‌های اسید لاکتیک نیز مشاهده می‌شود. سودا و همکاران در بررسی فعالیت اتولیتیکی سویه‌های لاکتیک مورد مطالعه خود را به سه گروه تقسیم بندی

1. pecies specific PCR reactions

۵- منابع

- [1] Etemadifar, Z., Rabbani, M., Azadbakht, E., Emami, H., and Khormali, M. 2012. Isolation and Molecular Identification of lactic acid bacteria from camel milk. 1st National Camel Congress: 16.
- [2] Edalatian, M. R., Najafi, M. B. H., Mortazavi, S. A., Alegría, Á., 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.
- [3] Ahmed, T., and Kanwal, R. 2004. Biochemical characteristics of lactic acid producing bacteria and preparation of camel milk cheese by using starter culture. *Pak. Vet. J.* 24: 87-91.
- [4] Khedid K., Faid M., Mokhtari A., Soulaymani A., and Zinedine A. 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological research*. 164(1): 81-91.
- [5] Salminen S., Von Wright A., and Ouwehand A. 2004. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects: CRC Press; Marcel Dekker. 73-103.
- [6] Garrity G.M., Bell J.A., and Lilburn T.G. Taxonomic outline of the prokaryotes. 2004. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg. 2nd ed. Vol (3). 484-489, 517, 598-599, 626, 664-671, 673-675, 680-71.
- [7] Lacerda I. C., Miranda R. L., Borelli B. M., Nunes Á. C., Nardi R., and Lachance M. A. 2005. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. *International journal of food microbiology*. 105(2): 213-9.
- [8] Ruiz-Barba J. L., Maldonado A., and Jiménez-Díaz R. 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical biochemistry*. 347(2): 333-5.
- [9] Bulut Ç. 2003. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese: İzmir Institute of Technology, İzmir.
- لاکتوباسیلوس کازئی (۱۶,۶۷±۴,۴۱) و انتروکوکوس فکالیس (۱۳,۳۳±۳,۳۳) به ترتیب فعالیت لیپولیتیکی بالایی (واحد فعالیت آنزیم در میلی‌لیتر) نشان دادند (۲۱). لاکتوباسیلوس فرمنتوم در این مطالعه نیز مشابه تحقیق ما فعالیت بالایی نشان داد. از طرفی در مقایسه با سایر مطالعات دیگر نظیر مطالعه‌ای که رای و همکارانش^۱ در سال ۲۰۱۱ در مورد جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک ماهی آب شیرین انجام دادند و فعالیت لیپولیتیکی انتروکوکوس فکالیس و پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی جدا شده را به ترتیب بیش از ۶ و کمتر از ۵ واحد در هر میلی‌لیتر از عصاره کشت (عصاره خام آنزیمی) گزارش کردند فعالیت لیپولیتیکی جدایه پدیوکوکوسی مورد مطالعه ما (۶,۲۵±۰,۴۱) بیشتر می‌باشد (۱۴). همانطور که قبلاً نیز اشاره شد، یک جدایه مناسب در زمینه تخمیر باید بتواند در دمای ۳۰°C در طی ۶ ساعت از کشت pH=۵±۰,۲ حاصل کند و یک باکتری تولید کننده سریع اسید باید به مدت ۳ ساعت از کشت اختلاف pH معادل ۰,۴ واحد (ΔpH=۰,۴ U) در دمای ۳۰°C ایجاد کند. چنین باکتری به عنوان استارتر جهت تخمیر اولیه پیشنهاد می‌شود و تولید کننده ضعیف اسید به عنوان کمکی بسته به خواص مورد انتظار از تخمیر استفاده می‌شود (۲۲). انتروکوکوس‌ها اسیدیفایرهای ضعیف هستند ولی در این جنس انتروکوکوس فکالیس قوی تر از بقیه است و در بین استارترهای مزوفیلیک تولید کننده اسید لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس و لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه کریموریس قوی شناخته شده است (۲۲). بنابراین بر اساس نتایج این مطالعه تمام گونه‌های لاکتیکی جدا شده از دوغ شتر قدرت کاهش اسید به میزان ۰,۴ واحد (ΔpH=۰,۴ U) بعد از ۳ ساعت از کشت را دارا می‌باشند. با توجه به اینکه کاهش سریع pH در ساعات اولیه کشت یک ویژگی مطلوب برای استارترهای لاکتیکی محسوب می‌شود، جدایه‌های لاکتیکی دوغ شتر در زمینه تولید اسید در سطح خوبی قرار می‌گیرند. ارزیابی فعالیت اتولیتیکی، لیپولیتیکی و تولید اسید توسط جدایه‌های لاکتیکی دوغ شتر نشان داد که گونه‌های لاکتیکی جدا شده از دوغ شتر ایرانی دارای پتانسیل تکنولوژیکی خوبی می‌باشند.

- phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(1): 109-12.
- [17] Mohania D., Nagpal R., Kumar M., Bhardwaj A., Yadav M., and Jain S. 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of digestive Diseases*. 9(4): 190-8.
- [18] Ouadghiri M., Amar M., Vancanneyt M., and Swings J. 2005. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS microbiology letters*. 251(2): 267-71.
- [19] Soda M. E., Ahmed N., Omran N., Osman G., and Morsi A. 2003. Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheesemaking. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 15(2).
- [20] Omafuvbe B. O., and Enyioha L. C. 2011. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from selected commercial Nigerian bottled yoghurt. *African Journal of Food Science*. 5(6): 340-8.
- [21] Ukwuru M.U., and Ibeneme C.I. 2014. Biotechnological Properties of Microorganisms Isolated from Traditional Fermented Foods. *Focusing on Modern Food Industry (FMFI)*. 3: 10-18.
- [22] Durlu Ozkaya F., Xanthopoulos V., and Tunail N. 2001. Litopoulou-Tzanetaki E. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*. 91(5): 861-70.
- [10] Hassaïne O., Zadi-Karam H., and Karam N.E. 2007. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). *African Journal of Biotechnology*. 6(14).
- [11] Ayad E. H., Verheul A., Wouters J., and Smit G. 2001. Population dynamics of lactococci from industrial, artisanal and non-dairy origins in defined strain starters for Gouda-type cheese. *International Dairy Journal*. 11(1): 51-61.
- [12] Ayad E. H. 2001. Characterisation of lactococci isolated from natural niches and their role in flavour formation of cheese: Wageningen Universiteit.
- [13] Thiboutot H., Dako E., El-Sado M., Vuilleumard J., Power N., and Simard R. 1995. Influence of heat and freeze shocking on the autolysis and peptidase activities of *Lactobacillus casei*. *Milchwissenschaft (Germany)*.
- [14] Rai A. K., and PM H. 2011. Isolation and characterization of potential lactic acid bacteria (LAB) from freshwater fish processing wastes for application in fermentative utilisation of fish processing waste. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42(4): 1516-25.
- [15] Yamada K., Ota U., and Machinda H. 1962. Studies on the Production of Lipase by Microorganisms. Part II: Quantitative Determination of Lipase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 36(10): 860-4.
- [16] Moraes P. M., Perin L. M., Silva Júnior A., and Nero L. A. 2013. Comparison of

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Drinking Yogurt of Iranian One Humped Camel milk and Evaluation of Their Technological Properties

Davati, N. ^{1*}, Zibae, S. ²

1. Assistant professor, Department of Food Science and Technology,
Bu-Ali Sina University. Hamadan, Iran.

2. Associate professor, Razi Vaccine & Serum Research Institute. Mashhad. Iran.

(Received: 2015/12/22 Accepted: 2016/02/22)

Camel milk has healing properties and health benefits. Lactic Acid Bacteria play an important role in quality of fermented products of camel milk such as Drinking Yogurt. A total of three samples of drinking yogurt of Iranian one humped camel milk (*Camelus dromedarius*) were collected from Golestan province in Iran under aseptic conditions. 32 bacteria by culturing on MRS agar medium were isolated. Among isolated bacteria, only four different isolates were phenotypically characterized that these isolates included *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus Ferintoshensis*, *Pediococcus pentosaceus* and *Enterococcus faecium*. Bacterial isolates were identified by amplification of the 16S rRNA gene by Polymerase Chain Reaction (PCR) and were then grouped by the Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) method. But, based on restriction analysis of 16S rRNA gene, the isolates were grouped into five ARDRA pattern that were identified by ribosomal DNA sequencing as *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus pentosaceus* and *Enterococcus lactis*. Evaluation of autolytic and lipolytic activity and acid production potential of isolates showed that technological potential of isolates from drinking yogurt of Iranian camel milk was remarkable.

Keywords: Camel, Drinking yogurt, Lactic Acid Bacteria, Technological Properties.

* Corresponding Author E-Mail Address: n.davati@basu.ac.ir