



مطالعه پتانسیل تکنولوژیکی انتروکوکوس های جداشده از شیر شتر ایران برای استفاده در صنعت غذا

نفسه دعوتی^۱، سعید زیبایی*^۲، فریده طباطبایی یزدی^۳، فخری شهیدی^۴، محمدرضا عدالنبان^۵

۱. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، ۲. اسنادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، ۳. دانشیار، ۴. اسناد، گروه علوم و صنایع غذایی و ۵. اسنادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه دانشگاه فردوسی مشهد

* Corresponding author: s.zibae@mrzi.ac.ir

مقدمه

از گذشته تا به امروز باکتریهای اسید لاکتیک نقش مهمی در ایجاد عطر، طعم، بافت، افزایش زمان ماندگاری، افزایش ارزش غذایی و خواص درمانی محصولات غذایی تخمیری نظیر فراورده های لبنی تخمیری داشته اند. در این خانواده بزرگ، جنس انتروکوکوس از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد که تعدادی از گروه باکتریهای پروبیوتیک را نیز شامل می شود. یکی از منابع تامین کننده خانواده بزرگ اسید لاکتیک باکتریها شیر حیوانات اهلی می باشد. شیر شتر یکی از منابع ارزشمند در این زمینه بوده که غذای اصلی ساکنین صحرا و بادیه نشین را تشکیل می دهد و تا حدودی ملل آسیای میانه، شبه جزیره عربستان و آفریقا از دیر باز تا کنون در تغذیه خود متکی به شیر شتر بوده اند. بنابراین گزارش فائو در سال ۲۰۰۹ تعداد شتر گزارش شده در دنیا ۲۶ میلیون و در سال ۲۰۰۸ تعداد شتر در ایران ۱۵۲۰۰۰ نفر ثبت شده است. طبق آمار گزارش شده توسط وزارت کشاورزی ایران تعداد شتر ۱۵۴۰۰۰ نفر در سال ۱۳۸۸ گزارش شده است که بیشترین تعداد به ترتیب متعلق به استانهای سیستان و بلوچستان، یزد و خراسان جنوبی می باشد. با توجه به مقاوم بودن شتر به شرایط سخت محیطی، پتانسیل بالای آن در جهت تامین معاش انسان با کیفیت مناسب (گوشت و شیر)، دوره شیرواری مناسب بین ۷ تا ۱۸ ماه و متوسط تولید شیر بین ۸ تا ۱۰ لیتر پرورش این حیوان در مناطق خشک و کویری به عنوان یک دام چندمنظوره همواره مورد توجه بوده است. شیر شتر از نظر ارزش غذایی، خواص درمانی و توان تکنولوژیکی دارای ویژگیهای منحصر به فردی است که بر ارزش تحقیقات انجام شده در ارتباط با آن می افزاید. فعالیت های تحقیقاتی بر روی حیوانات اهلی غالباً بر روی نژادهای قابل دسترس در نواحی معتدل اروپا و آمریکای شمالی متمرکز می شوند. بنابراین شتر تک کرهانه نژاد *Camelus dromedaries* یکی از گونه های مطمئن نادیده گرفته شده (نواحی استوایی و زیر

معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری، معاونت پژوهشی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، مؤسسه تحقیقات علوم دامی ایران، بنجر ن علمی شتر ایران



انسان جهاد کشاورزی استان کرمان



دانشگاه گیلان



استرایی) می باشد. بنابر مطالعات انجام شده باکتریهای اسید لاکتیک، فلور باکتریایی غالب موجود در شیر شتر می باشد.

اهداف

با توجه به مطالعات محدود انجام شده در زمینه جداسازی و شناسایی فلور میکروبی شیر شتر و از طرفی اهمیت باکتری-های جنس انتروکوکوس از خانواده اسید لاکتیک باکتریها در صنعت لبنیات و پروبیوتیکها هدف از این تحقیق بررسی اولیه فلور میکروبی شیر شتر تک کرهانه ایران و جداسازی انتروکوکوسهای آن می باشد. هدف بعدی شناسایی این باکتریها در سطح گونه بر اساس روشهای مولکولی خواهد بود.

مواد و روش ها

• نمونه‌گیری و جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک

ابتدا از شیر شتر تک کرهانه استان گلستان تحت شرایط استریل نمونه برداری شد. سپس رقت‌های سریالی ۰.۱، ۰.۰۱ و ۰.۰۰۱ از نمونه تهیه گردید. جهت شمارش کلی تعداد میکروارگانیسم‌ها از رقت‌های تهیه شده بر روی محیط PCA به صورت سطحی کشت گردید و تحت شرایط هوازی و بی‌هوازی (جار بی‌هوازی و گاز پک نوع A) در دمای 37°C به مدت 48 ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. جهت شمارش تعداد کلی قارچها از رقت‌های تهیه شده بر روی محیط YGC آگار کشت گردید و تحت شرایط هوازی در دمای 27°C به مدت 3 تا 5 روز گرمخانه‌گذاری گردید. جهت شمارش و جداسازی باکتریهای اسید لاکتیک از رقت‌های تهیه شده از محیط MRS آگار استفاده گردید و تحت شرایط بی‌هوازی (جار بی‌هوازی و گاز پک نوع A) در دمای 37°C به مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. سپس کلنی‌هایی که از نظر شکل ظاهری و تحدب با هم اختلاف داشتند به طور تصادفی انتخاب گردیدند و به طور خطی بر روی محیط MRS آگار کشت شدند و تحت شرایط بی‌هوازی (جار بی‌هوازی و گاز پک نوع A) در دمای 37°C به مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند. کلنی‌های خالص سازی شده از نظر مشاهده میکروسکوپی، آزمون کاتالاز و رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌هایی که از نظر تست کاتالاز منفی و و رنگ آمیزی گرم مثبت بودند جهت

معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری معاونت پژوهش‌های وزارت علوم تحقیقات و فناوری، مؤسسه تحقیقات علوم دامی ایران، بنجر ن علمی شتر ایران



شناسایی تا سطح جنس مورد بررسی قرار گرفتند و از نظر رشد در دو دمای 15°C و 45°C ، رشد در دو غلظت ۶.۵ و ۱۸ درصد کلرید سدیم، رشد در pH های ۴.۴ و ۹.۶ و تولید گاز CO_2 از گلکز مورد ارزیابی قرار گرفتند. باکتریهای که از نظر جنس انتروکوکسی شناخته شده بودند جهت ارزیابی برخی از پتانسیل های تکنولوژی استفاده شدند (۱).

• بررسی فعالیت پروتولیتیکی:

فعالیت پروتولیتیکی ایزوله ها به وسیله تکنیک کشت بر روی PCA agar + 2% Skim milk و بررسی هاله حاصل از پروتولیز ایجاد شده توسط ایزوله ها بررسی شد (۲).

• بررسی فعالیت لیپولیتیکی:

محیط کشت زیر (بر اساس گرم در لیتر) جهت بررسی فعالیت لیپولیتیکی بررسی شد. پپتون ۱۰، کلرید کلسیم ۰.۱، کلرید سدیم ۵ و آگار ۲۰. سپس محیط با آب مقطر به حجم رسانده شد و برای ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. ۱۰ میلی لیتر توئین ۲۰ (سیگما) استریل شده به آن اضافه شد و تحت شرایط استریل pH آن تا ۶ تنظیم شد. سپس از کشت تازه هر ایزوله به میزان ۱۵ میکرولیتر به محیط تلقیح شد و ۲۴ ساعت در 37°C درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد (۲).

• بررسی خاصیت پروبایوتیکی ایزوله ها:

مقاومت ایزوله ها در محیط صفراوی

ابتدا این ایزوله ها در MRS broth به مدت ۱۸-۲۰ ساعت در 37°C درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. و به میزان ۱٪ به محیط MRS broth + 0.4% bile و محیط MRS broth انتقال یافت. سپس کدورت حاصل از رشد بعد از ۰ و ۳ ساعت در 620 nm اندازه گیری شد. اگر طبق رابطه زیر بعد از ۲۴ ساعت درصد بقاء ۵۰ درصد یا بیشتر باشد از نظر مقاومت این ایزوله به عنوان پروبایوتیک عالی مطرح می شوند.

$$\text{Surviving (\%)} = \frac{\Delta OD (0\% \text{ BS}) - \Delta OD (0.4\% \text{ BS})}{\Delta OD (0\% \text{ BS})} \times 100$$



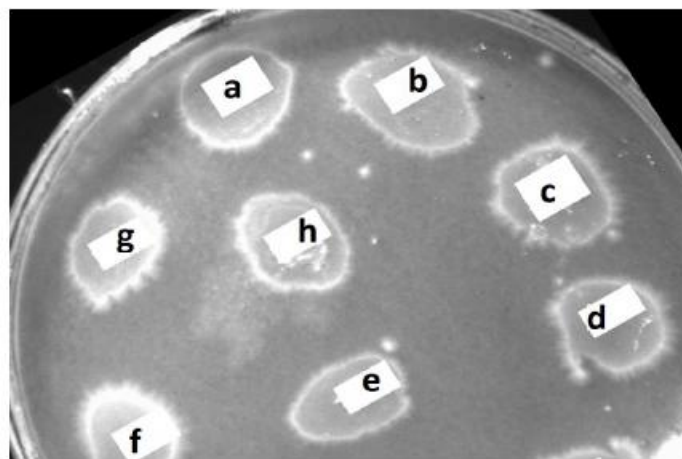
مقاومت ایزوله‌ها در محیط اسیدی

همچنین به میزان ۱٪ از محیط کشت فعال به MRS با pH=3 و pH=7 انتقال یافت و سپس کدورت حاصل از رشد بعد از ۰ و ۳ ساعت در ۶۲۰ nm اندازه گیری شد. بر اساس مطالعه‌ای که محققین انجام دادند. اگر طبق رابطه زیر بعد از ۲۴ ساعت درصد بقاء ۵۰ درصد یا بیشتر باشد از نظر مقاومت این ایزوله به عنوان پروبیوتیک عالی مطرح می‌شوند (۳).

$$\text{Surviving (\%)} = \frac{\Delta OD (pH7) - \Delta OD (pH3)}{\Delta OD (pH7)} \times 100$$

نتایج و بحث

Log CFU برای شمارش کلی تحت شرایط بی‌هوازی و هوازی، شمارش کلی فارچهاو شمارش باکتریهای اسید لاکتیک 6.34، 6.84، 3.41، 6.52 به ترتیب می‌باشد. بنابراین سهم باکتریهای اسید لاکتیک در جمعیت کل میکروبی قابل توجه می‌باشد. مشاهدات میکروسکوپیکی حضور باکتری‌های کوکسی شکل و باسیلی شکل را در شیر شتر تایید کرد. بر اساس مشاهدات میکروسکوپیکی و تست‌های بیوشیمیایی، ۸ ایزوله متعلق به جنس انتروکوکوس جداسازی گردیدند. نتیجه ارزیابی فعالیت‌های لیپولیتیکی و پروتئولیتیکی ایزوله‌های انتروکوکسی شیر شتر نشان داد که کلیه ایزوله‌ها از فعالیت لیپولیتیکی (شکل ۱) خوبی برخوردارند. شکل ۲ نشان داد که فقط ایزوله b و c فعالیت پروتئولیتیکی نشان دادند.



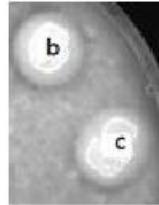
شکل ۱. فعالیت لیپولیتیکی انتروکوکسی‌های جدا شده از شیر شتر



انسان جهاد کشاورزی استان کرمان

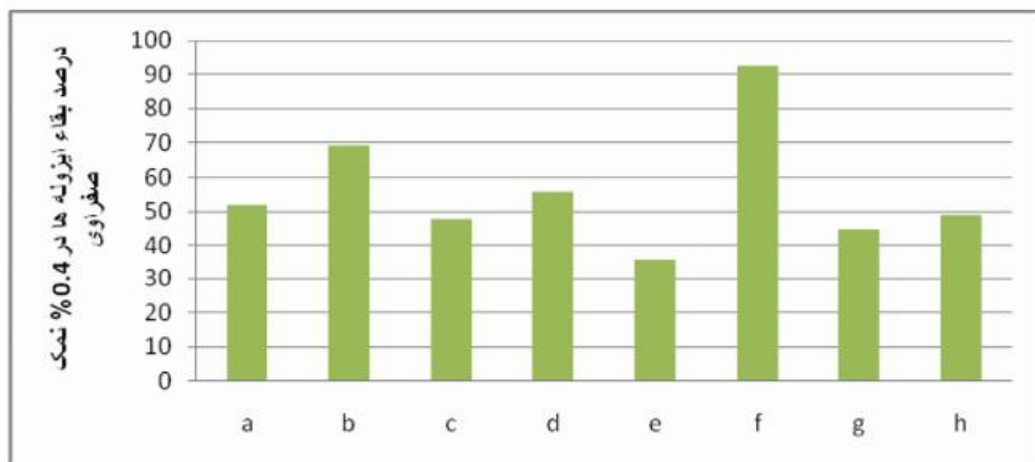


انگاه کرمان کلاوس

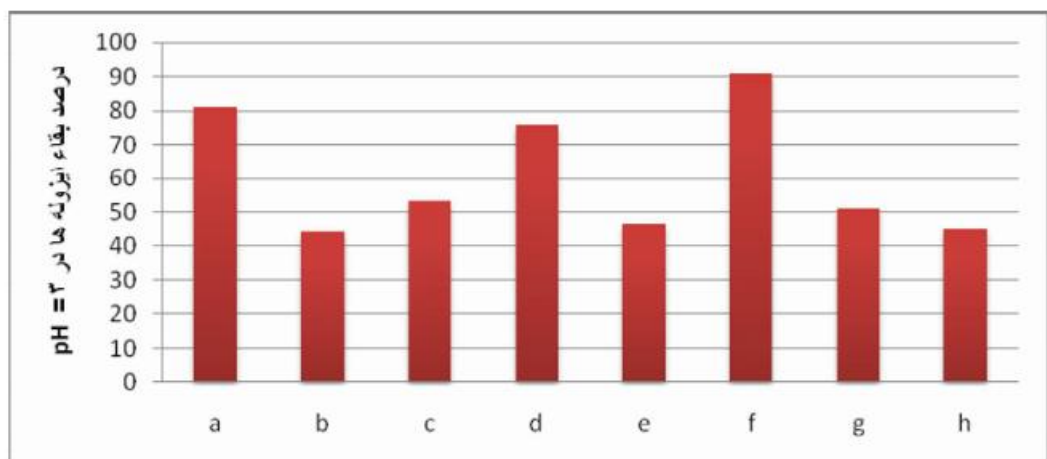


شکل ۲. فعالیت پروتئولیتیکی انتروکوکسی های جدا شده از شیر شتر

بر اساس شکل ۳ و ۴ ایزوله های انتروکوکسی a, d و f از نظر مقاومت در نمک صفراوی ۰.۴٪ و pH=3 عالی می باشند.



شکل ۳. مقاومت ایزوله های انتروکوکسی جدا سازی شده از شیر شتر به حضور ۰.۴٪ نمک صفراوی



شکل ۴. مقاومت ایزوله های انتروکوکسی جدا سازی شده از شیر شتر به pH=3

معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری معاونت پژوهش و برنامه ریزی وزارت علوم تحقیقات و فناوری، مؤسسه تحقیقات علوم دامی ایران، بنجران علمی شتر ایران



انسان جهاد کشاورزی ایران کرمان



انگاه گنبد کاووس



واژگان کلیدی: شتر، شیر، انتروکوکوس، پروتئولیتیک، لیپولیتیک، پروبیوتیک.

منابع

1. Salminen S, Von Wright A, Ouwehand A. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects: Marcel Dekker; 2004.
2. Guessas Bettache, Adjoudj Fatma, Hadadji Miloud and Kihal Mebrouk. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Their Major Technological Traits. World Applied Sciences Journal 17 (4): 480-488, 2012.
3. Djonne Victor SIELADIE; Ngoufack François ZAMBOU; Pierre Marie AKTCHAM, Alberto CRESCI and Florence FONTEH. 2011. PROBIOTIC PROPERTIES OF LACTOBACILLI STRAINS ISOLATED FROM RAW COW MILK IN THE WESTERN HIGHLANDS OF CAMEROON. Innovative Romanian Food Biotechnology. Vol. 9, Issue of September.



انسان جهاد کشاورزی ایران حکومتان



انگاه کتب کاوس



Study of Technological Potential of Isolated Enterococcus Bacteria from Camel Milk for Use in Food Industry

N. Davati¹, S. Zibae², F. Tabatabaee yazdi³, F. Shahidi⁴, M.R. Edalatian⁵

1. Student Of Food Microbiology. Ferdowsi University of Mashhad
2. Assistant Professor ,Department of Veterinary Research and Biotechnology, Razi vaccine and Serum Research Institute ,North East Branch, Mashhad , Iran
3. Department of Food Science Industry. Ferdowsi University of Mashhad
4. Professor, Department of Food Science Industry. Ferdowsi University of Mashhad
5. Professor, Department of Food Science Industry. Ferdowsi University of Mashhad

* Corresponding author: s.zibae@mrazi.ac.ir

Introduction: Mostly research activities on domestic animals are concentrated on species and breeds of animals available in the temperate zones of Europe and North America. So the one humped camel (*Camelus dromedarius*) is certainly one of the most neglected species of the domestic animals (the subtropics zones). Camel milk have unique nutrition and therapeutic properties. Such as other milk's domestic animals, lactic acid bacteria in Camel milk is domain microbial load.

Objective: The aim of this study is investigation microbial load of camel milk and also isolation of lactic acid bacteria based on enterococcus genus for use in food industry..

Materials & methods:

Inoculum was done on PCA (48h, 37°C), YGC (3-5 days, 27°C) and MRS (24h, 37°C) for total count, total fungi count and LAB count respectively . Bacterial isolates were tested for gram reaction, catalase activity, cell morphology and biochemical properties to identification in genus level. Then their technological potential (proteolytic and lipolytic activity) and their probiotic properties were evaluated.

Results & discution: Log CFU for total count under anaerobic & aerobic condition, fungi and lactic acid bacteria count included 6.34 , 6.84, 3.41, 6.52 respectively. So share of LAB in microbial community is significant. 9 LAB was isolated. Based on results of biochemical tests,8 isolates of LAB belonged to enterococcus genus. Results of technological evaluation of isolates showed that isolated bacteria of camel milk are useful for dairy in industry.

Keywords: Camel, Milk, enterococcus, proteolytic, lipolytic, probiotic.

معاونت علمی و فناوری یارست جمهوری اسلامی ایران، پژوهش و وزارت علوم تحقیقات و فناوری، مؤسسه تحقیقات علوم دامی ایران، بنجران علی شمیر ایران