نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد هفتم، شماره اول، ۹٤
٦١-٧٦
http://ejfpp.gau.ac.ir

جداسازی و شناسایی گونه‌های *لاکتوباسیلوس* از شیر خام و تعیین فعالیت اسیدی آنها

شریتا سلیمی‌نمین[1]، مرتضی خمیری[1*]، یحیی مقصودلو[1] و فرخ میرزانمدی[2]

[1]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
[2]دانشیار دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
[3]رییس هیات‌مدیره شرکت فن‌آوری زیستی رازی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۹؛ تاریخ پذیرش: ۲۹ /۹۳/۱۱

چکیده

سابقه و هدف: منافع اقتصادی اسید لاکتیک باکتری‌ها سبب شده تا تلاش‌های جدی جهت شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک بومی صورت گیرد.

مواد و روش ها: در این تحقیق جداسازی و شناسایی فنوتیپی لاکتوباسیلوس‌های شیر خام از دو مرکز جمع‌آوری شیر مناطق اردبیل و سراب انجام گرفت و توانایی کاهش pH جدایه‌ها به منظور کاربرد تکنولوژیکی آنها در تولید اسیدلاکتیک مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در مجموع ٦ کلنی از ١٤ کلنی مورد بررسی از نمونه‌های شیر خام به عنوان *لاکتوباسیلوس* شناسایی شدند. باکتری‌های *Lactobacillus plantarum*، *Lactobacillus acidophilus*، *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus curvatus* از شیر خام اردبیل و *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus brevis* از شیر خام سراب بر اساس تست‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی معمول برای شناسایی فنوتیپی گونه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی شدند. تحلیل آماری روند کاهش pH محیط کشت مایع MRS توسط ٦ جدایه‌ی حاصل در بازه زمانی ٤ تا ٤٨ ساعت نشان داد که بین جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

استنتاج: این گونه‌های بومی توانایی جایگزینی با استارترهای صنعتی رایج مورد استفاده را دارند.

واژه‌های کلیدی: جداسازی، شناسایی فنوتیپی، *لاکتوباسیلوس*ها، شیر خام، فعالیت اسیدی.

*نویسنده مسئول: khomeiri@gau.ac.ir

مقدمه

باکتری‌های اسیدلاکتیک گروهی از باکتری‌ها هستند که به سبب توانایی تولید اسید لاکتیک طی متابولیسم تخمیر همگن و ناهمگن، کاربرد زیادی دارند (۱۲). از میان باکتری‌های اسید لاکتیک، لاکتوباسیلوس‌ها نقش مهمی در فرایند تخمیر داشته و نسبت به باکتری‌های اسید لاکتیک کوکسی، در طول تخمیر توانایی تولید مقدار بیشتری اسید لاکتیک را دارند. بیان این موضوع که میزان تولید اسید لاکتیک در جهان حدود ۲۰۰ هزار تن در سال است، میلیون‌ها دلار ارز سالانه جهت واردات اسید لاکتیک از کشور خارج می‌شود (این روند هر ساله سیر صعودی به خود می گیرد) و تولید اسید لاکتیک تنها بخشی از کاربردهای مهم باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد، اهمیت این باکتری‌های پر نیاز در میکروبیولوژی صنعتی مشخص می‌گردد (۲۸). سودآوری تحقیقات در زمینه باکتری‌های اسید لاکتیک و نیاز تمامی کشورها به این باکتری‌ها سبب شده تا کشورهای در حال توسعه از مدت‌ها پیش تلاش‌های جدی جهت شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک بومی را آغاز کنند. باکتری‌های اسید لاکتیک را می‌توان از منابع وسیعی جدا کرد. انواع دانه‌ها، گیاهان سبز، سبزیجات تخمیری، محصولات لبنی، انواع ماهی و خاک منابعی هستند که بسته به نوع تحقیق می‌توانند برای جستجوی این باکتری‌ها مناسب باشند (۱۱). در سال‌های اخیر، محققان زیادی در کشورهای اروپایی میکروبیولوژی شیر خام را بررسی کردند، زیرا با وجود حضور انواع میکروارگانیسم‌ها در شیر خام، فلور میکروبی غالب شیر خام را باکتری‌های اسید لاکتیک تشکیل می‌دهند (٤). کشورهای پیشرفته حدود یک قرن است که به‌طور جدی به کشف و شناسایی گونه‌های جدید باکتری‌های اسید لاکتیک برای استفاده صنعتی پرداخته‌اند. علی‌رغم پهناور بودن ایران و داشتن تنوع بالای آب و هوایی و اکوسیستم‌های گوناگون، می‌توان برای یافتن باکتری‌های جدید و دارای پتانسیل صنعتی تلاش کرد، با این حال تنها چند سالی است که این مساله مورد توجه قرار گرفته است (۹). از جمله پژوهش‌های انجام گرفته در ایران نیز می‌توان به پژوهش‌های احمدی و همکاران (۲۰۰۹)، لطفی و همکاران (۲۰۰۹) و فرقانی و همکاران (۲۰۱۰) اشاره کرد (۹،۱،۱٤). حسنی وهمکاران (۲۰۰۸) علاوه بر مطالعاتی در زمینه جداسازی و شناسایی *لاکتوباسیلوس*های غالب در پنیر لیقوان، ویژگی‌های تکنولوژیکی جدایه‌ها را نیز بررسی کردند (۱۰). میردامادی و همکاران (۲۰۰۷) نیز بررسی‌هایی در زمینه تولید اسیدلاکتیک از سویه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس* انجام دادند (۱۵). هدف از انجام این پژوهش بررسی امکان جداسازی گونه‌های *لاکتوباسیلوس* از شیر خام با توانایی کاهش pH قابل مقایسه با گونه‌های تجاری وارداتی

است. امید است با یافتن گونه‌های دارای پتانسیل صنعتی بتوان به جایگزینی مناسب برای باکتری‌های تجاری وارداتی یافت.

مواد و روش ها

مواد: قندهای گالاکتوز، رافینوز، مانیتول، ریبوز، فروکتوز، مانوز، زایلوز، آرابینوز، لاکتوز، ملیبیوز، رامنوز، سوربیتول، ترهالوز، گزیلوز، گلوکز، دی سوربیت، ملزیتوز و ساکارز از نمایندگی شرکت مرک آلمان در تهران خریداری شدند. دِمن روگوسا آگار[1] (MRS) محیط کشت مورد استفاده برای جداسازی و خالص‌سازی بود که برای نگهداری، غنی‌سازی، شمارش و هم‌چنین جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک به‌عنوان رایج‌ترین محیط کشت *لاکتوباسیلوس*ها در این تحقیق استفاده شد. محیط کشت MRS از شرکت، های مدیا (هندوستان) تهیه شد.

روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: دو نمونه شیرخام از نمونه ۵ تنی دامداری‌های سنتی شهر اردبیل و نمونه ۳ تنی دامداری‌های شهر سرابتحویلی به کارخانه خورشید صبح اردبیل تهیه شد. نمونه‌ها جداگانه به مخازن دو جداره منتقل شده و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از اختلاط کامل در شرایط استریل ۵۰۰ میلی لیتر نمونه از هر یک از مخازن برداشت شده و برای انجام آزمون به آزمایشگاه منتقل شد.

تلقیح، بررسی و جداسازی: پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، رقت‌های متوالی از 10^{-1} تا 10^{-7} از هر ارلن (حاوی سوسپانسیونی با ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه شیر خام در۹۰ میلی‌لیتر محلول رینگر استریل) تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف تهیه شده از نمونه شیر خام روی محیط MRS آگار (در ۳ تکرار) تلقیح شد. پس از کشت سطحی، پلیت‌ها به مدت ٤۸ ساعت در جار بی‌هوازی حاوی گاز پک (مرک) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند (۲۰).

پس از پایان گرمخانه‌گذاری، کلنی‌هایی از روی هر پلیت با فیلدوپلاتین استریل برداشت شدند و با رنگ آمیزی گرم (هوکر) و استفاده از میکروسکوپ بررسی شدند. کلنی‌های دارای باکتری‌های میله‌ای یا کوکوباسیل گرم مثبت انتخاب شدند. کلنی‌های مورد نظر به‌صورت کلنی تک روی پلیت‌های جدید

1. De Man Rogosa Agar

حاوی محیط MRS جامد کشت خطی شده و به‌مدت ٤٨ ساعت در جار بی‌هوازی در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند و مجددا با میکروسکوپ (با بزرگ‌نمایی ٤٠ و ١٠٠) بررسی شدند. هدف از این کار جدا شدن مطمئن باکتری‌های مورد نظر از یکدیگر بود. باکتری‌های اسید لاکتیک گرم مثبت و کاتالاز منفی هستند، بنابراین برای تشخیص اولیه از تست کاتالاز استفاده شد. کلنی *لاکتوباسیلوس*ها از نظر متابولیکی بسیار مشابه سایر جنس‌های باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشند، تنها میله‌ای شکل بودن، آن‌ها را به سادگی از جنس‌های کوکسی، مانند ***Streptococcus***، ***Leuconostoc*** و ***Pediococcus*** متمایز می‌کند، از این رو فقط کلنی‌های میله‌ای یا کوکوباسیل، گرم مثبت و کاتالاز منفی برای مطالعه بعدی (شناسایی در سطح گونه) انتخاب شدند.

شناسایی نهایی: آزمون‌های فیزیولوژیک با بررسی رشد در محیط کشت MRS مایع حاوی غلظت‌های متفاوت کلریدسدیم ٢، ٤، ٥ و ٦٪ (٤) و محیط کشت MRS مایع استریل در سه دمای مختلف ١٥، ٣٧ و ٤٥ درجهٔ سانتی‌گراد در مدت زمان‌های به‌ترتیب ١٠ ، ٣ و١ روز (٢١) و در pHهای مختلف صورت گرفت. pH محیط کشت MRS مایع قبل از استریل کردن با استفاده از اسیدکلریدریک ٠/١ مولار روی ٣/٥، ٤، ٤/٥ و ٥/٢ تنظیم شد (٢٥).

آزمون‌های بیوشیمیایی شامل تخمیر قندها، تولید آمونیاک و شناسایی گروه‌های تخمیری بود. در این تحقیق، ١٨ ترکیب قندی برای آزمون تخمیر قندها استفاده شد. پس از تهیه محیط مایع تخمیر MRS و پخش این محیط در لوله‌های آزمایش به حجم ٢ میلی‌لیتر و استریلیزاسیون آن‌ها در اتوکلاو (دمای ١٢١ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١٥ دقیقه)، به هر محیط، ٢٠ میکرولیترمحلول قندی استریل شده با فیلتر ٠/٢٢ میکرون و ٠/٥ میلی لیتر معرف بروموکرزول بنفش اضافه شد و پس از تلقیح، در شرایط بی‌هوازی و گرم‌خانه گذاری در دمای٣٧ درجه سانتی‌گراد به مدت ٧٢ ساعت بررسی شد. تغییر رنگ از بنفش به زرد به‌عنوان نتیجه مثبت و عدم تغییر رنگ به‌عنوان نتیجه منفی گزارش شد (١٦).

در تحقیق حاضر، آزمایش هیدرولیز آرژنین با برداشت یک کلنی تیپیک توسط سوزن کشت از محیط کشت MRS جامد، انتقال به محیط کشت MRS مایع دارای آرژنین و محیط کشت مایع MRS بدون آرژنین (به‌عنوان شاهد)، پوشاندن سطح محیط تلقیح شده با مقداری پارافین غلیظ سترون، گرم-خانه‌گذاری در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٧٢ ساعت و بررسی تغییر رنگ از بنفش به زرد انجام گرفت (١٧).

شناسایی گروه‌های تخمیری با توجه به توانایی تولید گاز دی اکسیدکربن از قند گلوکز انجام شد. محیط کشت MRS مایع حاوی لوله دورهام برای بررسی توانایی جدایه‌ها از نظر تولید گاز از گلوکز استفاده شد. بعد از تلقیح کلنی در لوله‌های حاوی محیط کشت استریل شده وگرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدّت ٤۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی، تولید گاز در لوله‌ها بررسی شد. وجود گاز در لوله دورهام، نشانه ناهمگن بودن تخمیر و عدم وجود گاز ناشی از همگن بودن تخمیر تلقی شد (۲۳). نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی جدایه‌های شناسایی شده با خصوصیات بیوشیمیایی *لاکتوباسیلوس*ها در کتاب برگیس مطابقت داده شد و جدایه‌ها در سطح جنس و گونه شناسایی شدند (۲۳).

تعیین فعالیت اسیدی **جدایه‌ها**: برای تعیین فعالیت اسیدی جدایه‌ها، سویه‌ها به محیط کشت MRS مایع تلقیح و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس از کشت تازه فوق به نسبت ۱ درصد (حجمی در حجمی) به محیط کشت MRS مایع تلقیح شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید و مقدار pH در مدت زمان های ٤، ٦، ۲۰، ۲٤، ۲۸ و ٤۸ ساعت اندازه‌گیری شد (۷).

نتایج و بحث

مرفولوژی و ویژگی‌های کلنی: بر اساس مشاهدات مرفولوژیک، کلنی‌های غیرمشابه انتخاب و رنگ‌آمیزی گرم شدند. از کلنی‌های میله‌ای گرم مثبت آزمون کاتالاز انجام گرفت. در این مرحله از نمونه‌های شیرخام در مجموع ۱٤ کلنی از نظر مرفولوژیکی بررسی شد. بر اساس ویژگی‌های مرفولوژی و برخی تست‌های بیوشیمیایی، از ۹ کلنی مورد بررسی نمونه شیرخام گاوی اردبیل، ٤ کلنی و از ۵ کلنی مورد بررسی نمونه شیر خام گاوی سراب، ۲ کلنی جداسازی و خالص‌سازی شدند.

نتایج اوّلین دسته از آزمایش‌های شناسایی (مورفولوژی سلولی، کاتالاز و گرم) جدایه‌های شیر خام اردبیل و سراب در جدول ۱ نشان داده شده است. بررسی موارد مندرج در جدول ۱ در مجموع، ٦ کلنی از ۱٤ کلنی به‌عنوان *لاکتوباسیلوس* شناسایی شدند که در بین سایر جنس‌های باکتری‌های اسید لاکتیک بیشترین درصد فراوانی را به خود اختصاص دادند.

جدول ۱. نتایج شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های شیر خام

Table 1. The morphological characterization of isolates from raw milk

شهر City	تست کاتالاز Catalase test	واکنش گرم Gram reaction	مورفولوژی سلولی Cell Morphology	جدایه Isolate's Cod
اردبیل Ardebil	−	+	میله‌ای Bacilli	AM۱
اردبیل Ardebil	−	+	میله‌ای Bacilli	AM۲
اردبیل Ardebil	−	+	میله‌ای Bacilli	ABM۱
اردبیل Ardebil	−	+	میله‌ای Bacilli	ABM۲
سراب Sarab	−	+	میله‌ای Bacilli	SM۱
سراب Sarab	−	+	میله‌ای Bacilli	SM۲

علائم: + = مثبت و − = منفی. کلیه آزمون ها در ۳ تکرار انجام شد. حروف M، A و S در نام جدایه‌ها به‌ترتیب حروف اول واژه‌های Milk، Ardabil و Sarab می‌باشد (حرف B نیز برای مشخص کردن جدایه‌ها از نمونه شیر اردبیل به کار رفته است).

Symbols and Abbreviations: + = positive, - = negative. M, A, S and B in the name of the isolates represent Milk, Ardabil Sarab and the second series of milk samples collected from Ardabil respectively

ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی: بررسی نتایج ویژگی‌های بیوشیمیایی، جدایه‌ها بر اساس تولید و یا عدم تولید گاز از گلوکز به دو گروه الف و ب تقسیم شدند.

مطابق نتایج مندرج در جدول ۲ اکثر جدایه‌ها مزوفیل بودند. این مطلب می‌تواند به شرایط محیطی مانند دمای طبیعی این مناطق که از رشد جدایه‌های مزوفیل حمایت می‌کند، مربوط گردد. نتایج بررسی رشد در pH های مختلف نشان داد که کاهش pH محیط کشت، اثر ممانعت کنندگی در رشد *لاکتوباسیلوس*ها داشت، این امر با نتایج مطالعات ویندرولا و رینهیمر (۲۰۰۳) مطابقت داشت (۲۷). در زمینه توانایی جدایه‌ها برای تحمل غلظت‌های مختلف، آزیز و همکاران (۲۰۰۹) نتایج مشابهی به دست آوردند و نشان دادند که مقدار بالا و پایین pH، غلظت نمک و دما تاثیر قابل ملاحظه‌ای در رشد باکتری‌های اسید لاکتیک داشتند (٤).

جدول ۲. نتایج آزمون های بیوشیمیایی جدایه‌های شیر خام

Table 2. Results of the biochemical tests of the isolates from raw milk

جدایه‌ها Isolates		گروه الف A Group				گروه ب B Group	
آزمایش‌ها Testes		AM۱	SM۲	AM۲	ABM۱	SM۱	ABM۲
آمونیاک از آرژنین Ammonia from arginine		–	–	–	–	-	-
گاز از گلوکز Gas from glucose		–	–	–	+	+	ض/W
رشد در pH Growth in pH	3.5	ض/W	ض/W	–	ض/W	ض/W	ض/W
	4	+	+	+	+	+	+
	4.5	+	+	+	+	+	+
	5.2	++	++	++	+	++	++
رشد در درصد نمک The growth in different percentage of salt	2	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	ض/W –	+	ض/W	ض/W
	6	ض/W	ض/W		ض/W	–	–
رشد در دمای Growth in different temperature	15°C	+	+	–	+	+	+
	37°C	+	+	+	+	+	+
	45°C	–	–	ض	–	–	–

علائم: + = دارای رشد، ++ = رشد خوب، – = عدم رشد، ض = رشد ضعیف،

Symbols and Abbreviations, += Normal growth, ++= Excellence growth, W= Weak growth, - = No growth,

شناسایی *لاکتوباسیلوس*ها در سطح گونه (از طریق تخمیر قندها): نتایج آزمون تخمیر کربوهیدرات‌ها توسط جدایه‌های شیرخام اردبیل در جدول ۳ نمایش داده شده است. نتـایج زیـر از تطبیـق بـا کتـاب برگیس استنباط شد:

جدول ۳. نتایج آزمون تخمیر قند جدایه‌های شیر خام اردبیل

Table3. Results of fermentation tests of isolates from raw milk collected from Ardebil milk collection center

L. curvatus	ABM۲	*L. casei*	ABM۱	*L. acidophilus*	AM۲	*L. plantarum*	AM۱	تخمیر قندها Suger fermentation
+	+	+	+	+	+	+	+	دی- گلوکز D-Glucose
+	+	+	+	+	+	+	+	دی- گالاکتوز D Galactose
–	–	–	–	–	–	D	–	ال- آرابینوز L- Arabinose
+	+	+	+	+	+	+	+	دی- فر.کتوز D-Fructose
D	+	D	+	+	+	+	+	لاکتوز Lactose
+	–	+	+	+	+	+	+	مالتوز Maltose
–	–	+	+	–	–	+	+	دی- مانیتول D-Mannitol
+	+	+	+	+	+	+	ض W	دی- مانوز D -Mannose
–	–	–	–	D	–	+	+	دی- ملیبیوز D- Melibiose
–	–	+	+	–	–	D	–	دی- ملیزیتوز D-Melezitose
–	–	–	–	D	–	+	+	رافینوز Raffinose
–	–	–	–	–	–	–	–	ال- رامنوز L-Rhamnose
–	–	+	ض w	+	ض w	+	+	دی- سوربیتول D-Sorbitol
+	+	+	+	–	–	+	+	دی- ریبوز D-Ribose
–	–	–	–	–	–	D	–	دی گزیلوز D-Xylose
–	ض w	+	ض w	D	+	+	+	دی تره هالوز D-Trehalose
–	–	ت.ن ND	–	ت.ن ND	+	+	+	دی سوربیت-D Sorbit
D	–	+	+	+	+	+	+	ساکارز Sucrose

علائم: + = توانایی رشد یا توانایی تولید، – = عدم توانایی رشد یا عدم واکنش، ض= رشد ضعیف، ت. ن= تعیین نشده و D در ۸۹-۱۱ درصد سویه‌ها مثبت. کلیه آزمایش ها در ۳ تکرار انجام شد

Symbols and Abbreviations: += Normal growth, W= Weak growth, - = No growth, ND= Not determined, D = 11 – 89 % of strain are positive. All tests were performed at 3 replications.

پروفیل تخمیر جدایه AM۱ مشابه *L. plantarum* بوده است. *L. plantarum* به کرات توسط محققّین مختلف از شیرخام و فراورده‌های لبنی جدا شده است. حسنی و همکاران (۲۰۰۸) و احمدی و همکاران (۲۰۰۹) *L. plantarum* را از پنیر لیقوان جداسازی و شناسایی کردند (۱ و ۱۰). الگادی و همکاران (۲۰۰۸) بررسی‌هایی را برای جداسازی *L. plantarum* از شیرخام انجام دادند (۸). در آزمون تخمیر قندها فقط در یک مورد جدایه‌ها با هم فرق داشتند و آن توانایی استفاده از آرابینوز بود، سویه‌های مختلف *L. plantarum* توانایی متفاوتی در استفاده از این قند نشان دادند (مطابق با کتاب برگیس، جدول ۳). جدایه‌های شناسایی شده به‌عنوان *L. plantarum* در تحقیق عثماهان ازهری (۲۰۱۱) بسته به نژادشان در توانایی تخمیر گزیلوز متفاوت بودند (۳) و در این مورد نیز جدایه‌ی AM۱ قادر به تخمیرگزیلوز نبود که نتایج یکسانی به دست آمد.

جدایه AM۲ مشابه *L. acidophilus* بود. توگو و همکاران (۲۰۰۲) در تحقیقی جدایه‌ای مشابه *L. acidophilus* را در شیرخام شناسایی کردند (۲٦). الگادی و همکاران (۲۰۰۸) نیز سویه‌هایی از *لاکتوباسیلوس*های شیر خام را به عنوان *L. acidophilus* شناسایی کردند (۸). جدایه‌هایی که توسط آزیز و همکاران (۲۰۰۹) از شیر خام بوفالو جدا شده و به عنوان *L. acidophilus* شناخته شدند (٤) از بعضی جهات با جدایه AM۲ تفاوت داشتند ولی از لحاظ توانایی تخمیر قندها نتایج کاملاً با هم یکسان بودند.

جدایه ABM۱ مشابه *L. casei subsp. Casei* بود. برای تشخیص دقیق سویه‌ای به‌عنوان *L. casei*، نیاز به بررسی توالی ژنوم است، زیرا گروه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس* از جمله (*L. casei*، *L. plantarum*، *L. rhamnosus* و *L. zeae*) یک گروه تاکسونومیک تقریباً مرتبط را در *لاکتوباسیلوس*ها تشکیل می‌دهند. نتایج جدایه‌ی ABM۱ در تحقیق حاضر از نظر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی با نتایج کای و همکاران (۲۰۰۷) (٦) مطابقت داشت. مطالعات این محققان نشان داد که نژاد جدا شده *L. casei* از شیرخام و فراورده‌های لبنی توانایی بیشتری برای تخمیر لاکتوز دارد، که در تحقیق حاضر جدایه‌ی ABM۱ نیز توانایی استفاده از لاکتوز را داشت.

بر اساس اطلاعات کتاب برگیس، جدایه‌ی ABM۲ مشابه *L. curvatus* بود. *L. curvatus* توانایی رشد در pH=۳/۹ را داشت که یکی از ویژگی‌های مهم تمایز این سویه‌ها است. جدایه ABM۲ نیز در pH=۳/۵ رشد کمی داشت ولی در pH=٤ رشد خوبی داشت که نتایج با این ویژگی مطابقت داشت.

نتایج آزمون تخمیر کربوهیدرات‌ها توسط جدایه‌های شیرخام سراب در جدول ٤ نمایش داده شده است. جدایه SM۱ مشابه *L. brevis* بـود. *L. brevis* از منـابع مختلـف از جملـه *لاکتوباسـیلوس*هـای مزوفیل شیر یا لبنیات جدا شده و توسط تاناسوپاوات و همکاران (۱۹۹۳) شناسایی شد (٢٤).

نتایج بررسـی‌هـای ویژگـی‌هـای مختلـف جدایـه SM۱، از جملـه ویژگـی‌هـای فیزیولـوژیکی و ویژگی‌های بیوشیمیایی با نتایج سویه‌ای که فالاکورن کولا و همکاران (٢٠٠٦) مشابه *L. brevis* ١٤٨٦٩ *ATCC* تشخیص دادند (١٩)، یکسان بود. جدایه SM۲ مشابه *L. plantarum* قبلاً بحث گردید.

نتایج جداسازی سویه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس* از شیرخام در تحقیق حاضر با نتایج نـوروزی و همکاران (٢٠٠٨) در جداسازی *لاکتوباسیلوس*ها از شیر محلی (١٨) با فراوانـی‌هـای متفـاوت تشـابه زیادی داشت. بهادری و همکاران (٢٠١٠) برای جداسازی *لاکتوباسیلوس*ها از شیر خام، پنیر لرستان و همدان تحقیقی انجام دادند (٥) که نتایج آن با نتایج تحقیق حاضر مشابهت داشت.

به‌طور کلی شناسایی فنوتیپی باکتری‌های اسید لاکتیک بیشتر بر اساس مرفولوژی سلولی و تفـاوت در سوبستراهای کربوهیدراتی انجام می‌شود، اما در روش‌های شناسایی فنـوتیپی عـدم تکـرار پـذیری نتایج در همه آزمایشگاه‌ها مشکل ساز مـی‌باشـد، زیـرا عـلاوه بـر متفـاوت بـودن شـرایط کشـت در آزمایشگاه‌ها، تنوع گونه‌ها نیز زیاد است (١٤).

بررسی توانایی کاهش pH جدایه‌ها: عملکرد *لاکتوباسیلوس*هـای جـدا شـده بـا تعیـین خصوصـیات اسیدیفیکاسیون از طریق اندازه‌گیری pH بررسی شد.

کاهش pH محیط کشت MRS مایع به وسیله جدایه‌های شیر خام: روند کاهش pH محـیط کشـت مایع MRS توسط ٦ جدایه حاصل از شیر خام اردبیل و سراب به‌صورت نموداری در شکل ١ نمایش داده شده است.

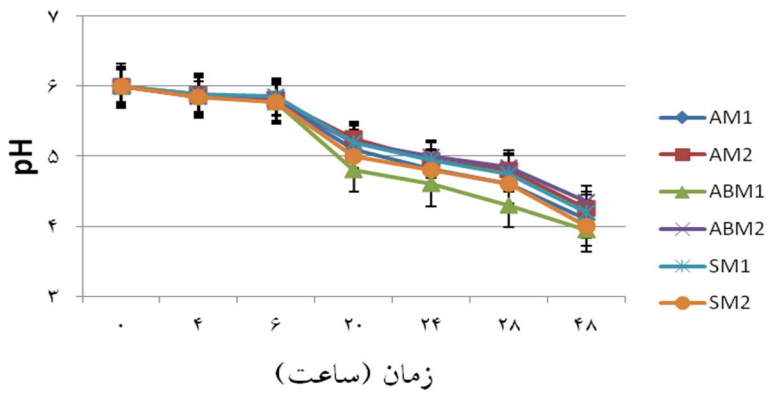
جدول ٤. نتایج آزمون تخمیر قند جدایه‌های شیرخام سراب

Table 4. Results of sugar tests of isolates from raw milk collected from Sarab milk collection center

تخمیر / قندها fermentation / Sugar	SM۱	*L. brevis*	SM۲	*L. plantarum*
دی- گلوکز D-Glucose	+	+	+	+
دی- گالاکتوز D Galactose	−	D	+	+
ال- آرابینوز L- Arabinose	+	+	−	D
دی- فر.کتوز D-Fructose	+	+	+	+
لاکتوز Lactose	+	D	+	+
مالتوز Maltose	+	+	+	+
دی- مانیتول D-Mannitol	−	−	+	+
دی- مانوز D -Mannose	−	−	+	+
دی- ملیبیوز D- Melibiose	−	+	+	+
دی- ملیزیتوز D-Melezitose	−	−	−	D
رافینوز Raffinose	+	D	+	+
ال- رامنوز L-Rhamnose	−	−	−	−
دی- سوربیتول D-Sorbitol	−	−	+	+
دی- ریبوز D-Ribose	+	+	+	+
دی گزیلوز D-Xylose	−	D	−	D
دی تره هالوز D-Trehalose	−	−	+	+
دی سوربیت-D Sorbit	−	−	+	+
ساکارز Sucrose	+	D	+	+

علائم: + = توانایی رشد یا توانایی تولید، − = عدم توانایی رشد یا عدم واکنش وض= رشد ضعیف، ت.ن= تعیین نشده و D. در ۸۹-۱۱ درصد سویه ها مثبت. کلیه آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شده است.

Symbols and Abbreviations: += Normal growth, W= Weak growth, - = No growth, ND= Not determined, D = 11 – 89 % of strain are positive. All tests were performed at 3 replications.



شکل ۱. تغییرات pH در طی تخمیر در محیط کشت MRS مایع توسط جدایه‌های حاصل از شیر خام

Figure 1. Changing of pH during the fermentation test in MRS broth by lactobacilli isolates from raw milk

دامنه تغییرات pH توسط جدایه‌های مورد بررسی طی ٤٨ ساعت در محیط کشت از ١/٦٥ تا ٢/٠٥ متغیر بود. دامنه تغییرات pH پس از ٢٤ ساعت برای سویه‌های *لاکتوباسیلوس* جداسازی شده توسط حسنی و همکاران (٢٠٠٨) از ٠/٧٧ تا ٢/٤٥ گزارش شده است (١٠). نتایج کاهش میزان pH با نتایج تحقیق کای و همکاران (٢٠٠٧) و پیراینو و همکاران (٢٠١٠) (٦ ، ٢٠) نیز مطابقت داشت. بر اساس گزارش این محققان بین باکتری‌های اسید لاکتیک، به جز *لاکتوباسیلوس*‌های مورد استفاده به‌عنوان آغازگر، *L. casei* بیشترین کاهش pH را نشان داد. بعد از جدایه‌ی ABM١، جدایه‌های AM١ و SM٢ (شماره‌های ١ و ٦) بیشترین کاهش pH را نشان دادند که قبلاً با استناد به نتایج بررسی‌های مختلف فنوتیپی، مشابه *L. plantarum* شناخته شده بودند و تفاوت مشاهده شده در pH نهایی دو جدایه‌ی فوق با تاکید بر توانایی‌های مختلف نژادهای *L. plantarum* قابل توجیه است. شیباتا و همکاران (٢٠٠٧) نیز استفاده از ٣ نژاد مختلف *L. plantarum* به مقادیر متفاوت تولید اسید لاکتیک دست یافتند (٢٢). در مطالعه میردامادی و همکاران (٢٠٠٧) نیز *L. plantarum* نسبت به *L. casei*، مقام دوم از نظر میزان تولید اسید را داشت (١٥) که با نتیجه این تحقیق مشابهت داشت. لازم به ذکر است که بر اساس گزارش کای و همکاران (٢٠٠٧) (٦) از بین دو جدایه‌ی CM١ و CM٢ که به‌ترتیب مشابه *L. plantarum* و *L. casei* بودند، جدایه CM١ لاکتات بیشتری نسبت به جدایه‌ی CM٢ تولید کرد. مقایسه آماری عملکرد جدایه‌ها درجدول ٥ نشان داده شده است. همان‌طوری که مشاهده می‌شود

بین جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (P>۰/۰۵). هم‌چنین، نتایج نشان داد که سویه‌های فوق از نظر کاهش میزان pH، مشابه سویه‌هایی با توان تولید صنعتی نظیر *L. casei* و *L. plantarum* است.

جدول۵: کاهش pH توسط جدایه‌های حاصل از شیرخام پس از ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷° C

Table 5. Reduction of pH by lactobacilli isolates from raw milk after 48h incubation at 37°C

جدایه‌ها Isolates	کد code	میانگین
AM۱	1	5.18 ±0.72
AM۲	2	5.28 ±0.65
ABM۱	3	5.04 ±0.83
ABM۲	4	5.29±۰0.61
SM۱	5	5.26 ±0.68
SM۲	6	5.14 ±0.75

نتیجه‌گیری کلی

جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس‌ها از شیر خام بر اساس ویژگی‌های ذکر شده برای لاکتوباسیلوس‌ها در کتاب برگیس انجام شد و تعیین فعالیت اسیدی جدایه‌ها نشان داد که امکان جداسازی سویه‌های لاکتوباسیلوس با توانایی تولید قابل توجه اسید لاکتیک، از شیر خام وجود دارد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از جناب آقای پیمان اذغان کارشناس‌ارشد باکتریولوژی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل که در انجام این تحقیق همکاری نموده اند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Ahmadi, M., Khomeiri, M., Khosroshahi, A., and Kashani-Nejad, M. 2009. Isolation and identification of lactic acid bacteria isolated from traditional cheese Lighvan. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources. 16(3): 1-11.
2. Aquilanti, L., Dell' Aquila, L., Zannini, E., Zocchetti, A., and Clementi, F. 2006. Resident lactic acid bacteria in raw milk Canestrato Pugliese cheese. Letters in Applied Microbiology. 43(2): 161-167.
3. Asmahan Azhari, A. 2011. Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk in Khartoum State, Sudan. Dairy Science. 6: 66-71.

4. Aziz, T., Khan, H., Bakhtair, S.M., and Naurin, M. 2009. Incidence and relative abundance of lactic acid bacteria in raw milk of buffalo, cow and sheep. Animal & Plant Sciences. 19 (4): 168-173.
5. Bahadori, Z., Norouzi, J., Akhavan Sepehi, A., Sabzevari, J., and Razavipour, R. 2010. Study of β-galactosidase activity in Lactobacilli separated from milk and cheese by biochemical and PCR methods. Quarterly Research Journal of Lorestan University of Medical Sciences. 12 (1): 39-48.
6. Cai, H., Rodriguez, B.T., Zhang, W., Broadbent, J.R., and Steele, J.L. 2007. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. Microbiology. 153: 2655-2665.
7. Durlu-Ozakaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., and Litopoulou-Tzanetaki, E. 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes milk. Applied Microbiology. 91: 861-870.
8. Elgadi, Z.A.M., Abdel Gadir, W.S., and Dirar, H.A. 2008. Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeast from raw milk in Khartoum State (Suda). Microbiology. 3(3): 163-168.
9. Forghani, F., Nazemi, A., sharifi, Sh., and eskandari, M. 2010. Isolation and molecular identification of lactic acid bacteria of raw milk samples collected from the mountaintops of central Alborz using by High Resolution Melting Real Time PCR and 16S rDNA PCR Sequencing. Journal of microbial Technology. 2(5): 21-28.
10. Hasani, M., Farajnia, S., Hesari, J., and Musavi, M. H. 2008. Isolation of two species of lactobacillus from traditional Lighvan cheese and determination of their important functionality properties. 18th national congress of food technology Mashhad. I. R. Iran.
11. Kathiresan, K., and Thiruneelakandan, G. 2003. Prospects of lactic acid bacteria of marine origin. Indian Journal of Biotechnology.
12. Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Hols, P., Hutkins, R., Chaillon, S., Deutscher, J., Gasson, M., Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Kleerebezemm, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., Mckay, L., Mills, D., Nauta, A., Orerbeek, R., Pel, H., Pridmor, D., Saier, M., Sinderen, D., Sorokin, A., Steel, J., OSullivan, D., Vos, W., Weimer, B., Zagore, CM., and Siezen, R. 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. Antonie Leeuwenhoek. 82: 22-58.
13. Linko, Y., and Javanainen, P. 1996. Simultaneous liquefaction saccharification and lactic acid fermentation on barley starch. Enzyme Microbiology Technology. 19:118–123.
14. Lotfi, H., Hejazi, M.A., Maleki Zanjani, B., and Barzegari, A. 2009. Isolation, biochemical and molecular identification of potentially probiotic bacteria from traditional dairy products from Heris and Sarab Regions. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 20.3 (1): 1-17.

15. Mirdamadi, S., Rajabi, A., Aziz Mohseni, F., and Momen, B. 2007. Lactic acid production by Lactobacillus strains. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2(3): 57-64.
16. Nair, P.S., and Surendran, P.K. 2004. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from Fish and Prawn. Culture Collections. 4: 48-42.
17. Naseri razlighi, A., and Naseri razlighi, A. 2009. Food microbiology. Ayiizh Pub., Tehran., Iran, 373pp.
18. Nowroozi, J., Rahbare Roshandel, N., and Gheytanchi, E. 2008. Study of beta-galactosidase enzymes activity produced by lactobacilli in milk and cheese. Qom University of Medical Sciences Journal. 2(1).
19. Phalakornkule, C., and Tanasupawat, S. 2006-2007. Characterization of lactic acid bacteria from traditional THAI fermented sausages. Culture Collections. 5: 46-57.
20. Piraino, P., Zotta, T., Ricciardi, A., McSweeny, P.L.H., and Parenle, E. 2008. Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from Pasta filata cheese: A multivariate screening study. International Dairy Journal. 18: 81-92.
21. Schillinger, U., and Lucke, F.K. 1989. Antibacterial of *lactobacillus sake* isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology. 55: 1901-1906.
22. Shibata, K., Flores, D.M., Kobayashi, G., and Sonomoto, K. 2007. Direct L-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic Lactic acid bacterium *Enterococcus faecium*. Enzyme and Microbial Technology. 41: 149-155.
23. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. 1986. Bergay's Manual of Systamatic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore. 2: 634p.
24. Tanasupawat, S., Okada, S., Suzuki, K., Kozaki, M., and Komagata, K. 1993. Bull. JFCC. 9: 65-78.
25. Thamarj, N., and Shah, N.P. 2003. Selective enumeration of *lactobacillus* bulgaricus, *Str. Thermophilus*, *Lactobacillus. acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus. casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Propionibacteria*. Dairy Science. 86(7): 2288-2296.
26. Togo, M.A., Feresu, S.B., and Mutukumira, A.N. 2002. Identification of lactic acid bacteria isolated from opaque beer (chibuku) for potential use as a starter culture. Food Technology Africa. 7(3): 93-97.
27. Vinderola, C.G., and Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria, A Comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Research International. 36: 895-904.
28. Zhu, Y.Y., and Zhang, Y. 2000. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. Applied Microbiology and Biotechnology. 83:597–610

EJFPP, Vol. 7(1): 61-76
http://ejfpp.gau.ac.ir

Isolation and identification of *Lactobacillus* spp. from raw milk and determination of their acid producing ability

S. Salimi Namin[1], M. Khomiri[2]*, Y. Maghsoudlou[2], and F. Mirzanamadi[3]

[1]MSc Student, Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, [2]Associate Prof., Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran,[3] Board Chairman of Razi biotechnology company, Ardebil, Iran.

Received; 2014/02/28; Accepted: 2015/02/18

Abstract

Background and objectives: Economic benefits of lactic acid bacteria have encouraged microbiologist to identify local bacteria for industrial use.

Materials and methods: In this study *Lactobacillus* spp. were isolated from raw milk that had been collected from two domestic milk collection centers, Sarab and Ardebil, Iran. These isolates were characterized by phenotypic methods and their ability to reduce pH as a technological property was determined.

Results: Six out of 14 isolates were identified as *Lactobacillus* spp. based on biochemical and physiological characterization. The following species were identified: *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. curvatus*, *L. casei* and *L. berevis* from Ardabil raw milk collection center and *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus berevis* from Sarab milk collection center. Statistical analysis of pH reduction of MRS broth by 6 isolates revealed that there is no significant difference between the isolates' ability during 4 to 48 hours incubation.

Conclusion: we conclude that these native species are suitable alternatives for industrial starter cultures.

***Keywords*:** isolation, phenotypic identification, *Lactobacillus* spp., raw milk, acidification activity.

*Corresponding author; khomeiri@gau.ac.ir