نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هفدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۰،
پیاپی ۴۳ : ۱۵۷-۱۴۵

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

بررسی خواص پروبیوتیکی لاکتوباسیل های جدا شده از شیر گاو منعقد شده

ساناز کوشا[۱]، حامد اهری*[۲]، گیتی کریم[۳]، سید امیر علی انوار[۴]

۱- دانشجوی دکتری بهداشت مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- استاد بهداشت و کنترل کیفیت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

۴- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۱

چکیده

هدف از انجام این مطالعه شناسایی خصوصات پروبیوتیکی باکتریهای اسید لاکتیک جدا شده از شیر گاو منعقد شده است که شامل خاصیت ضد قارچی و ضد میکروبی، تحمل pH اسیدی،مقاومت به صفرا، تخمیر قندها، قابلیت همولیز خون، پتانسیل اسیدی کردن و ایجاد لخته از برخی روستاهای استان تهران میباشد.

ازمجموع ۱۳ نمونه شیر جمع آوری شده، ۷ جدایه بر اساس تستهای فنوتیپی و بیوشیمیایی به عنوان باکتری اسید لاکتیک شناسایی شدند. به منظور تایید نتایج بیوشیمیایی، DNA آنها استخراج و توسط PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی تکثیر و متعاقبا محصولات PCR توالی یابی و در بانک ژن NCBI ثبت شدند.

نتایج نشان داد همه جدایه ها همولیز مثبت بودند. جدایه A و C همولیز کامل داشتند. جدایه E بیشرین مقاومت را در شرایط اسیدی از خود نشان داد. در حالی که تمام جدایه ها به شرایط صفرا مقاوم بودند. سوپرناتانت حاصل از باکتری های لاکتیک روی *اشرشیا کلی* تاثیر داشته است و هاله عدم رشد ایجاد شد اما روی استاف و قارچ ها اثری نداشت. تمام جدایه های لاکتیکی توانایی تولید اسید و انعقاد را در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نشان دادند. در مقابل، هیچ یک از جدایه ها پتانسیل انعقاد را در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد نشان ندادند.

بر اساس نتایج این مطالعه، جدایه Eو C جدا شده از شیر منعقد شده گاو با توجه به خواص مشاهده شده میتواند به عنوان میکروارگانیسم پروبیوتیک در نظر گرفته شود و میتوان آنها را در تولید لبنیات پروبیوتیک خالص سازی و استفاده کرد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، باکتری های اسید لاکتیک، شیر

*نویسنده مسئول: حامد اهری

آدرس: گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیک: dr.h.ahari@gmail.com

مقدمه

امروزه دیگر ضرورت مصرف روزانه و مناسب لبنیات و مخصوصا شیر بر کسی پوشیده نیست.ویکی از معیارهای سنجش سطح سلامت افراد در جامعه سرانه مصرف لبنیات در آن جامعه می باشد.

شیر به دلیل سرشار بودن ازاملاح ضروری و پروتئین و ویتامین فراوان به عنوان یکی از کاملترین غذاها شناخته شده است. کلسیم که نقش اساسی در شکل گیری و استحکام استخوانها و سلامت دندانها دارد از مهمترین ترکیبات موجود در شیر است. کلسیم برای بسیاری از واکنش های شیمیای بدن و فعال کردن آنزیمها لازم است و دررشد و ترمیم بافتی دخالت دارند. کلسیم درمیان املاح موجود در شیر حضور داشته و بغیر از آن سدیم و پتاسیم که در تنظیم اسیدی و بازی بودن سلول های بدن نقش ایفا می کنند با خوردن شیر دریافت میشوند(۱۰).

شیر به دلیل دارا بودن باکتر ی های لاکتیکی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. شیری که به صورت خام در معرض محیط قرار بگیرد سرانجام در اثر تولید اسید لاکتیک منعقد خواهد شد. باکتری های لاکتیک که همواره در شیر موجود میباشند لاکتوز شیر را به اسید لاکتیک تبدیل میکنند، نتیجه این تغییر کاهش pH محیط است. اسید لاکتیک تولید شده باعث تخریب ساختمان میسلی کازئین شده که این پدیده به دنبال ترکیب اسید با کلسیم موجود در ساختار میسلی رخ میدهد و در نتیجه میزان مواد معدنی در میسلهای کازئین کاهش میابد. برای رسیدن به مهاجرت کامل مواد معدنی به فاز محلول، pH محیط باید تا pH نقطه ایزوالکتریک کازئین یعنی ۴/۶کاهش یابد(۸،۹،۱۱).

محققین دریافته اند که باکتریهای مولد اسید لاکتیک را می توان برای تخمیر مواد غذایی، اثرات پروبیوتیک و نگهداری مواد غذایی مورد استفاده قرار داد(۵). با توجه به این که جدایه های باکتری های اسید لاکتیک از منابع بومی بدست آمده اند و متابولیت های تولیدی آن ها از رشد باکتری های شاخص بیماری زا جلوگیری کرده اند در نتیجه ،استفاده بیشتر از آنها به عنوان آغازگر ، یا عوامل ضد میکروبی طبیعی در تولید فرآورده های صنعتی تخمیری و همچنین در فرمولاسیون فرآوردههای غیر تخمیری توصیه می شود(۷،۱۷). هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی باکتریهای اسید لاکتیک از شیر خام و غیر پاستوریزه منعقد شده به روش آنزیمی استان تهران بوده است.

مواد و روش ها:

نمونه گیری ۱۳ نمونه شیر از ۱۳ دامداری واقع در برخی از روستاهای استان تهران جمع آوری شد. نمونه ها به صورت سترون جمع آوری و در محفظه های استریل دردار نگهداری شد. سپس در کنار یخ به آزمایشگاه انتقال یافت.تهیه شیر لخته شده: به همه نمونه های جمع آوری شده ، به منظور تولید لخته آنزیمی ،آنزیم رنین به نسبت ۰/۰۵۵ گرم در ۱ کیلوگرم شیر اضافه شد و چند ساعت در۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا لخته تشکیل گردید (۲). از لخته ایجاد شده روی محیط MRS آگار و M17 کشت داده شد و تمام پلیت ها در جار CO2 قرار گرفت (در شرایط میکرو ائروفیلیک).. برای شناسایی اولیه باکتریهای اسید لاکتیک تستهای گرم وکاتالاز انجام شد(۲۰). باسیل های گرم مثبتی که کاتالاز منفی بودند و روی MRS رشد یافته بودند به عنوان لاکتو باسیل در نظر گرفته شد. خصوصیات مورفولوژی سلولی در زیر میکروسکوپ بررسی شد و باسیل یا کوکسی بودن آن تایید گردید.سپس آزمون تخمیر قندها انجام شد. در این تحقیق ۶ ترکیب قندی شامل ملزیتوز، سوربیتول، لاکتوز، مالتوز، گالاکتوز،

آرابینوز، برای آزمون تخمیر قندها استفاده شد. فنل رد براث اتوکلاو شد. محلول قندی استریل شده با فیلتر ۰/۴۵ میکرو متر، با غلظت ۱۰٪ اضافه شد. حجم های ۲ سی سی آماده شد(۶).

بررسی تحمل اسید باکتری های اسید لاکتیک

تنظیم pH محیط کشت MRS براث توسط اسید هیدروکلریک به2/00 تنظیم شد. ۱۰ میکرو لیتر از کشت ۲۴ ساعته جدایه ها با ۲۴۰ میکرولیتر محیط MRSبا pH تنظیم شده در میکروول پلیت مخلوط شد و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت گرمخانه گذاری گردید. سپس رقت های متوالی در زمان های ۰ و ۲ ساعت تهیه و به صورت سطحی در MRS آگار کشت داده شد. ۲۴ –۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه گذاری شد و درصد زنده مانی با شمارش باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت (۱).

بررسی مقاومت به صفرا باکتری های اسید لاکتیک

محیط کشت MRS براث تهیه شد. قبل از اتوکلاو به آن ۰/۳ درصد Oxgall اضافه و اتوکلاوگردید. باکتری ها ۴۸ ساعت در MRSبراث کشت شد. پس از ۴۸ ساعت سانتریفیوژ گردید .مایع رویی خارج شد. رسوب با سالین نیم درصد ۲ بار شستشو داده شد. تا حدی در سالین معلق گردید تا کدورت به نیم مکفارلند رسید و با غلظت ۱ درصد به محیط حاوی صفرا اضافه گردید و در گرم خانه قرار گرفت و زمان های صفر ۱ و ۲ و ۴ ساعت شمارش گردید (۵).

بررسی خصوصیات ضد میکروبی و ضد قارچی باکتری های اسید لاکتیک

برای ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی جدایه های لاکتیکی از *اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس و ژئوتریکوم کاندیدوم* استفاده شد.

از تمام ارگانیسم ها کشت تازه تهیه شد و سپس در سرم فیزیولژی سوسپانسیون از آنها تهیه گردید که کدورتی در حد نیم مک فارلند داشت. پس از این که سوسپانسیون آماده و محیط TSA نیز خنک شد مقداری از محیط کف پلیت ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اضافه گردید و مثل عدد ۸ لاتین با محیط کشت مخلوط شد و بعد از بسته شدن محیط چاهک هایی در محیط کشت ایجاد شد.

از طرف دیگر جدایه های لاکتیکی روی آبگوشت MRSمعمولی کشت و ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه قرارداده شد. پس از ۴۸ ساعت سانتریفیوژ گردید. مایع رویی برداشته و دوباره ۱۰ دقیقه سانتریفیوژشد. سپس از مایع رویی برداشته و درون چاهک ها ریخته و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه قرارداده شد. سپس ایجادهاله شفاف اطراف چاهک ناشی از عدم رشد میکروب بررسی شد.

برای بررسی اثر ضد قارچی جدایه ها ابتدا در سرم فیزیولوژی سوسپانسیون قارچی معادل نیم مک فارلند تهیه و در ۲۵ درجه قرارداده شد. سپس بر روی YGC اگار که محیط اختصاصی کشت کپک و مخمر هاست، کشت سطحی داده شد و در ۲۵ درجه قرارگرفت. کلیه میکروارگانیسم ها رشد خوبی را در محیط های کشت نشان دادند. قطر هاله عدم رشد قارچ در اطراف خطوط کشت داده شده جدایه های لاکتیکی اندازه گیری شد (۵،۱۵،۱۹).

بررسی توانایی اسیدی کردن و ایجاد لخته

محیط شیر بدون چربی استریل به میزان ۱۰ درصد تهیه و در لوله هایی تقسیم شدند. سپس به هر کدام از آنها سوسپانسیونی از جدایه هایی به میزان^{۸}۱۰ به نسبت ۱ درصد اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰

درجه سانتی گراد و ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری و مقدار pH به وسیله pH متر اندازه گیری شد (۱۸).

بررسی فعالیت همولیتیک

برای این منظور، سویه های جدا شده لاکتیکی روی کلمبیا آگار حاوی ۵ درصد خون انسان کشت و دردمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. عدم تغییر رنگ یا ایجاد هاله در پلیت ها به معنی عدم هیدرولیز خون در نظر گرفته شد (۱،۴).

شناسایی مولکولی جدایه های لاکتیکی

پس از شناسایی اولیه گونه های غالب پروبیوتیک با استفاده از روش های ذکر شده و بررسی میکروسکوپی، سویه های جدا شده با استفاده از روش PCR مبتنی بر 16 S rDNA شناسایی شدند. به طور خلاصه، DNA نمونه‌ها از سوسپانسیون‌های تازه جدایه‌های لاکتیکی با استفاده از کیت استخراج (شرکت تکاپوزیست، ایران) استخراج شد و ژن 16 S rDNA با روش PCR با استفاده از پرایمر فوروارد و ریورس طراحی شده R ('5- AAGGAGGTGA/TTCCAA/GCC-3') - 1525 و -AGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG 3' -5') F- 27 برای تکثیر با برنامه حرارتی که در جدول زیر آمده انجام شد. و متعاقبا محصولات آن، توسط (شرکت ژنتیک کدون) توالی یابی شدند(۶،۱۷).

جدول ۱. دماهای مراحل واکنش زنجیره پلیمراز ما و مدت زمان آنها درسیکل ۳۵ بار تکرار

مراحل واکنش زنجیره پلیمراز	مدت زمان	دما / درجه
دناتوره سازی اولیه	۳ دقیقه	۹۴
دناتوره سازی	۴۵ ثانیه	۹۳
آنیلینگ	۱ دقیقه	۵۹
اکستنشن	۹۰ ثانیه	۷۲
طویل سازی نهایی	۵ دقیقه	۷۲

الکتروفورز: در مرحله الکتروفورز ابتدا احتیاج به ژل الکتروفورز داشتیم. ژل الکتروفورز از مخلوط اگارز + بافر الکتروفورز هست. بافر اضافه شد.پودر آگارز نیز افزوده شد. اینجا اگارز گرید مولکولی بود. حرارت دادیم. تا حل شد. نسبت ژل ۱/۵ در صد ایجاد و به آن رنگ ریماسایت اضافه شد. داخل قالب الکتروفورز ریخته و اجازه دادیم تا ببندد.بعد کامب از داخل ژل خارج شد که یک قطعه مستطیلی آگارز که داخلش چاهک بود تشکیل شد. هر کدام از نمونه هایمان داخل یک عدد از این چاهک ها لود شد و در جریان الکتریکی گذاشته شد. جریان الکتریکی همیشه از قطب منفی به قطب مثبت هست .اسید دزوکسی ریبونوکلئیک بار الکتریکیش منفی هست وقتی در مجاورت جریان الکتریکی قرار میگیرد به سمت قطب مثبت حرکت میکند .جریان الکتریکی را قطع کردیم. زیر UV گذاشته شد چون رنگ فلور سنت وجود داشت هر جا نمونه ما مثبت بود یک باند درخشان دیده شد. کنار نمونه ها چیزی به نام لدر هم لود کردیم. که مثل یک نردبان اسید دزوکسی ریبونوکلئیک هست که مشخص می کند هر کدام از این رشته ها چه سایزی دارد مثلا اینجا ما انتظار داشتیم نمونه های مثبت ما روبروی bp 1500باند بدهند.که این حالت دیده شد یعنی مرحله اول ما تایید شده است. همان با پرایمرهای فوروارد و

ریورس برای شـــرکـت ژنتیک کدون برای تعیین توالی فرستاده شد. (۶،۱۷).

نتایج

بر اساس ویژگی های مورفولوژیکی مشخص گردید که ۷ باکتری میله ای شکل، گرم مثبت، کاتالاز منفی و غیر اســپورزا بـه جنس لاکتوبـاســیلوس از خانواده اســید لاکتیک باکتری ها تعلق داشتند (تصویر ۱).

تصویر ۱: آزمون گرم جدایه های لاکتیکی لخته شیر خام

جدول ۲. نتایج شناسایی مورفولوژی جدایه های لاکتیکی لخته شیر خام

جدایه	مورفولوژی سلولی	واکنش گرم	تست کاتالاز
جدایه A	میله ای	+	_
جدایه B	میله ای	+	_
جدایهC	میله ای	+	_
جدایه D	میله ای	+	_
جدایه E	میله ای	+	_
جدایه G	میله ای	+	_
جدایه H	میله ای	+	_

آزمون تخمیر قندها

تخمیر شـــش قنـد مـالتوز، لاکتوز، آرابینوز، گالاکتوز، ملزیتوز وســوربیتول توسـط سـویه های جدا شـده مورد بررســی قرار گرفت. باکتری هایی که قابلیت تخمیر را داشــتند قند را تخمیر کردند و محیط اسـیدی شـد و به رنگ زرد در آمدند. مشــخصــات تخمیر نشــان داد که جـدایـه A بـه تـرتـیـب بـرای مـالـتـوز، لاکـتوز، آرابینوز،گـالاکتوز، ملزیتوز وســوربیتول مثبـت، منفی، مثبـت، مثبـت، مثبت و منفی بود.جدایه D قابلیت تخمیر تمـام قنـدها را داشــت و جدایه C توانایی تخمیر تمام قندها به جز ســوربیتول را داشــت.جدایه E هم توانایی تخمیر مالتوز، لاکتوز، آرابینوز و گالاکتوز را داشــت. جدایه های G, B و H قادر به تخمیر هیچ یک از قندها نبودند.

جدول ۳. نتایج آزمون تخمیر قندهای جدایه های لاکتیکی لخته شیر خام

	مالتوز	لاکتوز	آرابینوز	گالاکتوز	ملزیتوز	سوربیتول
جدایه A	+	-	+	+	+	-
جدایه B	-	-	-	-	-	-
جدایه C	+	+	+	+	+	-
جدایه D	+	+	+	+	+	+
جدایه E	+	+	+	+	-	-
جدایه G	-	-	-	-	-	-
جدایه H	-	-	-	-	-	-

تحمل pH اسیدی

تحمل pH اسیدی بررسی شد. میزان بقای باکتری های مولد اسید لاکتیک کشت شده در شرایط اسیدی با pH ۲/۰ در طی ۱ ساعت کاهش معنی داری نشان داد. همه سویه ها کاهش تدریجی تعداد کلنی ها را به دنبال انکوباسیون در شرایط اسیدی به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه نشان دادند (جدول ۴). جدایه A حساس ترین سویه به pH اسیدی بود، زیرا تعداد کلنی های آن پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری از $۱/۳ \times ۱۰^{۷}$ به کمتر از ۱۰۰ کاهش یافت. در حالی که جدایه E بالاترین مقاومت را در برابر شرایط اسیدی نشان داد. جدایه های C و D پس از قرار گرفتن در معرض pH ۲/۰ برای مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه سطح ثابتی از زنده ماندن را حفظ کردند. نتایج حاصل در جدول زیر ذکر شده است:

جدول ٤. بررسی تحمل pH اسیدی جدایه های لاکتیکی لخته شیر خام

	زمان صفر	۳۰	٦۰
جدایه A	$۱/۳ \times ۱۰^{۷}$	<۱۰۰	
جدایه B	۸×۱۰^{۷}	۲×۱۰^{۶}	$۳/۵ \times ۱۰^{۴}$
جدایه C	$۱/۵ \times ۱۰^{۷}$	۱×۱۰^{۳}	<۱۰۰
جدایه D	۱×۱۰^{۷}	۴×۱۰^{۳}	
جدایه E	$۲/۳ \times ۱۰^{۷}$	۱×۱۰^{۶}	$۵/۵ \times ۱۰^{۴}$
جدایه G	$۱/۱ \times ۱۰^{۷}$	۵×۱۰^{۵}	$۱/۵ \times ۱۰^{۴}$
جدایه H	۹×۱۰^{۷}	۴×۱۰^{۳}	<۱۰۰

مقاومت به صفرا

شرایط صفرا بیشترین تأثیر را بر روی زنده ماندن جدایه های B و D نشان داد (جدول ۵). تعداد کلنی های آنها بعد از ۱ ساعت از حدود $۱۰^{۷}$ به $۱۰^{۲}$ و بعد از ۲ و ۴ ساعت به کمتر از ۱۰۰ کاهش یافت ($p<0/05$). سویه‌های دیگر نیز کاهش زنده‌مانی را با روند آهسته‌تری در طی ۴ ساعت قرار گرفتن در شرایط صفرا نشان دادند. جدایه C و E زنده ماندن خود را در طول قرار گرفتن در معرض صفرا حفظ کردند. هر دو جدایه کاهش معنی داری در تعداد کلنی ها بعد از ۱ ساعت نسبت به ۲ ساعت نشان نداد ($p<0/05$) . می توان آنها را به عنوان سویه های مقاوم در برابر ۰/۳۰ درصد نمک صفراوی در نظر گرفت.

جدول ۵. بررسی مقاومت به صفرا جدایه های لاکتیکی لخته شیر خام

	زمان صفر	۱ ساعت	۲ ساعت	۴ ساعت
جدایه A	۱/۳×۱۰ ۷	۱/۵×۱۰ ۴	۹×۱۰ ۳	۱×۱۰ ۳
جدایه B	۸×۱۰ ۷	۱×۱۰ ۲	<۱۰۰	<۱۰۰
جدایه C	۱/۵×۱۰ ۷	۵×۱۰ ۶	۱×۱۰ ۶	۵×۱۰ ۵
جدایه D	۱×۱۰ ۷	۱×۱۰ ۲	<۱۰۰	<۱۰۰
جدایه E	۲/۳×۱۰ ۷	۴×۱۰ ۶	۱/۵ ۱۰ ۶	۱×۱۰ ۵
جدایه G	۱/۱×۱۰ ۷	۸×۱۰ ۳	۲×۱۰ ۳	۱×۱۰ ۲
جدایه H	۹×۱۰ ۷	۱/۳×۱۰ ۴	۷×۱۰ ۳	۴×۱۰ ۲

ارزیابی خاصیت ضد قارچی و ضد میکروبی جدایه های لاکتیکی

خاصیت ضد قارچی و ضد میکروبی جدایه های لاکتیکی بررسی شد. هیچ یک از سویه ها فعالیت ضد قارچی در برابر *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و *ژئوتریکوم کاندیدوم* از خود نشان ندادند، در حالی که همه آنها با ایجاد منطقه بازدارندگی شفاف بیش از ۵ میلی متر در برابر اشریشیا کلی فعالیت ضد باکتریایی از خود نشان دادند. علاوه بر این، هیچ کدام از جدایه ها فعالیت ضد میکروبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* نداشتند (جدول۶).

جدول ٦ . ارزیابی خاصیت ضد قارچی و ضد میکروبی جدایه های لاکتیکی بر اساس تشکیل هاله عدم رشد

	آسپرژیلوس پارازیتیکوس	*ژئوتریکوم کاندیدوم*	*اشرشیا کلی*	*استافیلوکوکوس آرئوس*
جدایه A	-	-	+	-
جدایه B	-	-	+	-
جدایه C	-	-	+	-
جدایه D	-	-	+	-
جدایه E	-	-	+	-
جدایه G	-	-	+	-
جدایه H	-	-	+	-

نتایج نشان داد که سوپرناتانت حاصل از باکتری های لاکتیک روی *اشرشیا کلی* تاثیر داشته است اما روی *استاف* و قارچ ها اثری نداشته و هیچ هاله عدم رشدی وجود نداشت.

بررسی قابلیت همولیز خون

قابلیت همولیز خون بررسی شد. همه جدایه ها از نظر فعالیت همولیتیک مثبت بودند (جدول ۷). جدایه های A و C همولیز بتا را نشان دادند، خون را به طور کامل همولیز و یک منطقه شفاف اطراف کلونی ها ایجاد کردند. در حالی که سایر جدایه ها همولیز آلفا را نشان دادند و توانستند تا حدی خون را همولیز کنند و یک ناحیه سبز رنگ ایجاد کنند.

جدول ۷. بررسی قابلیت همولیز خون جدایه های لاکتیکی لخته شیر خام

	همولیز بتا	همولیز آلفا
جدایه A	+	
جدایه B		+
جدایه C	+	
جدایه D		+
جدایه E		+
جدایه G		+
جدایه H		+

توانایی اسیدی کردن و ایجاد لخته

جدایه های لاکتیکی از نظر توانایی اسیدی کردن و ایجاد لخته بررسی شدند. در ۳۰ درجه تفاوتی ایجاد نشد اما در ۳۷ درجه لخته لوله A را کاملا بسته بود ودر لوله D هم لخته کل لوله را فرا گرفت.در بقیه لوله ها هم لخته ایجاد شد.

جدول ۸. اندازگیری pH و قابلیت ایجاد لخته جدایه های لاکتیکی لخته شیر خام

	pH	قابلیت ایجاد لخته
جدایه A	۳/۸۵	+
جدایه B	۵/۳۰	+
جدایه C	٦	+
جدایه D	٤	+
جدایه E	۵/۷۵	+
جدایه G	۵/۳۵	+
جدایه H	۵/۵	+

آزمایش جدایه های لاکتیکی برای تولید اسید لاکتیک

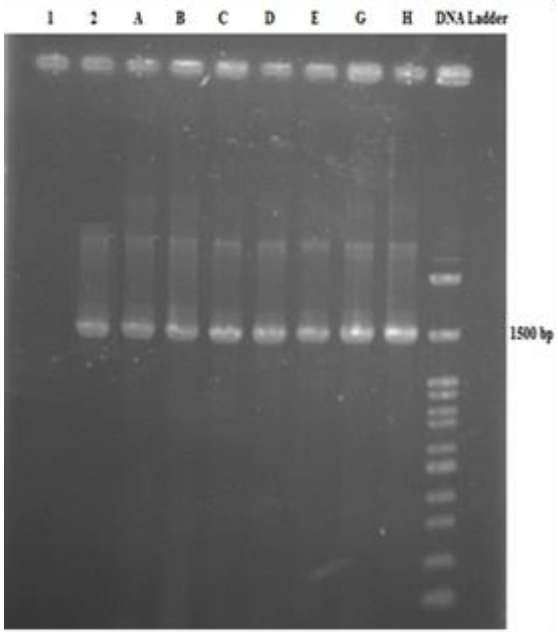
تولید اسید یکی دیگر از ویژگی های مفید برای باکتری ها است که به عنوان پروبیوتیک در صنایع غذایی و استراتژی های درمانی استفاده می شود. توانایی تولید اسید لاکتیک در جدایه های لاکتیکی بر اساس حجم سود مورد استفاده برای تیتراسیون اسید ارزیابی شد. همانطور که در جدول۹ نشان داده شده است، جدایه های Aو H به ترتیب بالاترین و کمترین میزان اسید لاکتیک را تولید کردند.

جدول ۹. تیتر با سود ۰/۱ نرمال

	حجم سود مصرفی	اسیدیته g/l اسید لاکتیک
جدایهA	۲/۵	۲/۲۵
جدایهB	۱/۴	۱/۲۶
جدایهC	۱/۳	۱/۱۷
جدایهD	۱/۲	۱/۰۸
جدایهE	۱/۱	۰/۹۹
جدایهG	۱/۵	۱/۳۵
جدایهH	۱	۰/۹

شناسایی مولکولی جدایه های لاکتیکی

بر اساس ارزیابی اولیه صورت گرفته، تکثیر DNA پرگنه های عمده خالص جدا شده از لخته شیر با پرایمرهای اختصاصی با الکتروفورز محصولات PCR انجام و تعلق این باکتری ها به جنس لاکتوباسیل تایید شد.



تصویر۲: ژل الکتروفورز محصولات PCR با توالی هدف ۱۵۰۰ جفت باز، جهت شناسایی جدایه های لاکتیکی لخته شیرخام(A,B,C,D,E,G,H) در مجاورت مارکر .DNA نمونه کنترل مثبت حاوی DNA حاصل از کشت خالص *لاکتوباسیلوس*(۲). نمونه کنترل منفی فاقد DNA (۱).

جدایه ها تعیین توالی شدند(شرکت ژن فن آوران) و سویه های شناسایی شده که شامل سویه های جدید *لاکتوباسیلوس پارابوچنری* ، *لاکتوباسیلوس بوچنری* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بودند در بانک اطلاعاتی NCBI به ترتیب با شماره های MT۵۰۹۵۲۴,۱,MT۵۰۹۵۲۵,۱,MT۵۰۹۵۲۱,۱ ثبت شدند .

بحث:

پروبیوتیک ها فلور طبیعی در دستگاه گوارش انسان هستند و فوایدی برای سلامت انسان دارند و می توانند در صنایع درمانی، پزشکی و غذایی استفاده شوند.امروزه مردم بیش از ایمنی سایر محصولات، از جمله داروها و مواد آرایشی ، نگران ایمنی غذایی هستند. از طرف دیگر، با تغییر در رژیم غذایی مردم، بیماری های جدیدی ظهور کرده و همچنین بیماری های قدیمی در اشکال جدید ظاهر می شوند. راه حل هایی برای رفع نگرانی در مورد حفظ کیفیت غذا ارائه شده است. و یافته های اخیر در مورد حفظ محصولات گوشتی عمدتا به منظور حفظ بیولوژیکی، به ویژه استفاده از میکرو فلور محافظ، با تأکید بر باکتری های اسید لاکتیک است. اصولاً مواد مغذی که به عنوان پروبیوتیک طبقه بندی می شوند باید دارای یک سری ویژگی های خاص باشند. در این مطالعه باکتری های پروبیوتیک از لخته های آنزیمی شیر جدا شد. داده های ما نشان داد که ۷ مورد از ۱۳ باکتری جدا شده از نظر مورفولوژیکی باسیل بودند. و جدایه ها را از نظر ویژگی های پروبیوتیکی بررسی کردیم (۲۰).

طبق نتایج آزمون گرم همان طور که در تصویر ۱ قابل ملاحظه هست ۷ جدایه از نظر شکل ظاهری میله ای و از لحاظ رنگ آمیزی، گرم مثبت بودند و نتایج آزمون کاتالاز، کاتالاز منفی بودن جدایه های لاکتیکی را نشان دادند. آنها توانستند در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در محیط MRS آگار تحت شرایط میکروآئروفیلیک رشد کنند. پس از این که *لاکتوباسیل* بودن آنها توسط بررسی های مولکولی تایید شد، تخمیر شش قند برای این سویه ها آزمایش شد. به جز جدایهB ، G وH همه آنها قادر به تخمیر تمام یا بخشی از قندها بودند. جدایه Dقابلیت تخمیر تمامی قندهای مالتوز، لاکتوز، آرابینوز،

گالاکتوز، ملزیتوز و سوربیتول را داشت و در نتیجه دارای قابلیت تخمیر بالایی می باشد. در مطالعه ای که توسط پتروویک و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام شد نشان داد سویه های متعلق به *L.curvatus* توانایی تخمیر قند های مالتوز، ساکارز و سلوبیوز را داشتند اما قادر به تخمیر اسکولین، مانیتول، ملزیتوز، سوربتول، رافینوز، زایلوز، گلوکونات و ملیبیوز نبودند(۱۹) در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۴ توسط پرتوی و همکاران انجام شد تمام سویه های متعلق به *L. plantarum* توانایی تخمیر سلوبیوز ، فروکتوز، گلوکز، مالتوز، مانوز، ملزیتوز و ساکارز را داشتند. و تمام سویه های متعلق به *L. brevis* قادر به تخمیر آرابینوز، فروکتوز، گلوکونات، مالتوز، ریبوز، زایلوز و همچنین هیدرولیز اسکولین بودند، در حالی که آنها ملزیتوز و سوربیتول را تخمیر نمی کردند(۱۷). همچنین طی نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر مشخص شدکه همه جدایه ها دارای خواص ضد باکتریایی در برابر *Escherichia. coli*هستند. که این فعالیت ضد میکروبی را می توان به برخی عوامل مانند متابولیت ها، اسیدهای آلی و باکتریوسین های آزاد شده از جدایه ها در محیط نسبت داد. از طرفی هیچ گونه فعالیت ضد میکروبی در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده نشد که این نتایج با نتایج به دست آمده توسط بن برک اولفا و همکارانش مطابقت داشت. در حالی که در مورد *Escherichia coli*، نتایج آنها در تضاد با نتایج ما بود (۶). فعالیت ضد باکتری جدایه های لاکتیکی دربرابر ۴ عامل بیماریزای ناشی از مواد غذایی توسط ابوشلابی و همکاران در سال ۲۰۱۷ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج گزارش شده توسط آنها با فعالیت های ضد میکروبی مطالعه حاضر مطابقت داشت. نتایج مطالعه انجام یافته توسط آنها حاکی از آن است که هر ۹ جدایه علیه *Escherichia coli*فعالیت ضد میکروبی نشان دادند و ۲ جدایه علیه *S. aureus* خاصیت ضد میکروبی نداشتند (۱).

هر ۷ جدایه مطالعه حاضر در معرض اسید و آزمایش تحمل صفرا قرار گرفتند. رشد جدایه ها در جریان ۲ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه تحت شرایط اسیدی pH معادل ۲/۰ کاهش نشان داد. جدایه B, E و G بیشترین مقاومت را در برابر اسید نشان دادند. هر ۷ جدایه در برابر صفرا مقاوم بودند. جدایه G , H, A,E,C مقاومت بیشتری در برابر صفرا نشان دادند. از سوی دیگر تحمل به اسید و صفرا جدا یه های لاکتیکی توسط ابوشلابی و همکاران در سال ۲۰۱۷ هم مورد بررسی قرار گرفت. حساس بودن به شرایط اسیدی شبیه سازی شده و شرایط صفرا با کاهش رشد جدایه ها مشخص شد (۱). همچنین تست تحمل اسید و صفرا برای جدایه های لاکتیکی توسط آرچر و همکاران ۲۰۱۵ انجام شد. بیشتر جدا یه ها تحمل بالایی نشان دادند. و دو سویه *L. fermentum 511* و *L. fermentum MCC 2760* تحمل کمتری نشان دادند.

مطالعه دیگری در مورد تحمل *لاکتوباسیلوس* ها به اسید و صفرا توسط ماروکی و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد. تحمل بالاتر جدا یه های انتخاب شده در مطالعه حاضر در مقایسه با موارد گزارش شده توسط آنها مشاهده شد (۱۶).

جدول ۷ فعالیت همولیزی ۷ جدایه منتخب ما را نشان می دهد. بر اساس آزمون های انجام شده، بر خلاف مطالعه ابوشلابی و همکاران ۲۰۱۷، همه جدایه های ما همولیز مثبت بودند. جدایه A و C همولیز کامل و ۵ جدایه همولیز ناقص داشتند.

جدایه های لاکتیکی از نظر توانایی اسیدی کردن و ایجاد لخته بررسی شدند. در ۳۰ درجه تفاوتی ایجاد نشد اما در

۳۷ درجه لخته لوله Aرا کاملا بسته بود و در لوله D هم لخته کل لوله را فرا گرفت. در بقیه لوله ها هم لخته ایجاد شد.

سویه *E. lactis* در سال ۲۰۱۸توسط بن بریک و همکاران از نظر فعالیت اسیدی کردن مورد بررسی قرار گرفت. حداقل pH سویه ها ظرف ۲۴ ساعت رشد در شیر از ۶ به مقادیر pH بین ۴/۳۹ و۴/۵۸ کاهش نشان داد. این مقادیر پس از ۱۰ و ۱۲ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به دست آمدند(۶).

نتیجه گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، با توجه به خواص مشاهده شده، جدایه E و C جدا شده از شیر منعقد شده، می تواند به عنوان میکروارگانیسم پروبیوتیک در نظر گرفته شود. می توان آنها را به منظور استفاده در تولید لبنیات پروبیوتیک جدا کرد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله تحقیقاتی حاصل بخشی از رساله دکترای تخصصی در رشته بهداشت موادغذایی است. نویسندگان مقاله از دستاندرکاران آزمایشگاه پاستور به خاطر همکاری در زمینهٔ ارائه امکانات آزمایشگاهی برای انجام این پایان نامه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. Abushelaibi A, Al-Mahadin S, El-Tarabily K, Shah NP, Ayyash M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT - Food Science Technology*. **79:** 316-325
2. Acik M, Cakiroglu F. P, Altan M, Baybo T. (2020). Alternative
source of probiotics for lactose intolerance and vegan individuals: sugary kefir.*Food Science and Technology*. **40:** 523-531
3. Ali M. K. (2019). Isolation of Lactobacillus strain from curdled milk and investigation of their antimycotoxinogen activity. *Journal Food Process Preservation*. 1-7
4. Archer A, M. Halami P. (2015). Probiotic attributes of Lactobacillus fermentum isolated
from human feces and dairy products. *Appl Microbiol Biotechnol*. **99:**8113–8123
5. Angmo K, Savitri A.K, Bhalla T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *Food Science and Technology*. **66:** 428-435
6. Ben Braïek O, Morandi S, Cremonesi P, Smaoui S, Hani K, Ghrairi T. (2018). Safety, potential biotechnological and probiotic properties of bacteriocinogenic Enterococcus lactis strains isolated from raw shrimps. *Microb. Pathog*. 1-27
7. Corsetti A.M. (1998). Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by Lactobacillus sanfrancisco CB1. l. *Appl Microbiol Biotechno*. **50:**253-256
8. DeVuyst L. a. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. **13:**194-199
9.Dincer E, Kivanc M. (2020). Characterization of Lactobacillus plantarum strains
isolated from Turkish pastırma and possibility to use of food industry. *Food Science and Technology*. **40:** 498-507
10. Gerhardt P, Murry R. G. E, Costilow R. N, Nester E. W, Wood W. A, Kreig N. R,

Phillips G. (1981). Manual of Methods of General Bacteriology, *Amer. Society Microbiol*. 409-443

11. Hassan Y. I. (2008). Antifungal activity of Lactobacillus paracasei ssp. tolerans isolated from a sourdough bread culture *Int. J. Food Microbiol*. **121:** 112-115
12. Kazeminia M, Mahmoudi R, Ghajarbygi P, Moosavi S. (2019). The Effect ofSeasonal Variation on the Chemical and Microbial Quality of Raw Milk Samples Used in Qazvin, Iran. *Journal of Chemical Health Risks*. **9:** 157-165. doi:10.22034/jchr.2019.66582
13. Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. **41:** 103-125
14. Lacroix C, Yildirim S. (2007). Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Curr. Opin. Biotechnol*. **18:** 176-83
15. Lim S, Im D. (2009). Screening and Characterization of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **19:** 178–186
16. Marroki A, Bousmaha-Marroki L. (2014). Lactobacilli Isolated from Algerian Goat's Milk as Adjunct Culture in Dairy Products. *Brazilian archives of biology and technology an international journal*. **3:** 410-420
17. Partovi R, Gandomi H, Akhondzadehbasti A, et al. (2014). Microbiological & Chemical propertis of Siahmazgi cheese, an Iranian artisanal cheese:Isolation and idenrification of dominant lactic acid bacterial. *Journal of Food Processing and Preservation*. 1745-4549
18. Paster N. a. (1988). Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. *International Journal Food Microbiol*. **7:** 257-265
19. Petrovic T. Z, Ilic P, Grutovic M, Mladenovic K. (2021).Lactobacillus curvatus from fermented sausages as new probiotic functional foods. *Food Science and Technology*.
20 .Rojo-Bezares B, Saenz Y, Poeta P, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, Torres C. (2006). Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *International Journal Food Microbiology*. **111:** 234-240
21 .Schnürer J. a. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci Technol*. **16:** 70-78
22. Shangpliang H. N. J, Sharma S, Rai R, Tamang J. P. (2017). Some Technological Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dahi and Datshi, Naturally Fermented Milk Products of Bhutan. *Front Microbiol*. **8:**1-6
23. Virolainen NE, Pikkemaat MIG, Elferink JA, Karp MT. (2008). Rapid detection of tetracyclines and their 4-epimer derivatives from poultry meat with bioluminescent biosensor bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56
24. Zuniga M, Pardo I, Ferrer S. (1993). An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International Journal Food Microbiol*. **18:** 37-42

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 17, Issue 2, Autumn & Winter 2021

Evaluation of probiotic properties of lactobacilli Isolated from coagulated cow's milk

Sanaz Kousha [1], Hamed Ahari [2*], Gity Karim [3], Seyed Amir Ali Anvar [4]

1. PhD Student of Food Hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Associate Professor, Department of food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University.
3. Professor, Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University.
4. Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Science and Research Branch

Received: 7 December 2021 *Accepted: 3 October 2022*

Abstract

The aim of this study was to investigate the probiotic characteristics of the isolated lactic acid bacteria (LAB) in coagulated cow's milk including antimicrobial activities, acid and bile tolerance, fermentation profile, hemolytic properties, acidification and coagulation collected from some villages of Tehran province were examined.

Among the 13 milk samples collected, 7 isolates were identified as lactic acid bacteria based on phenotypic and biochemical tests. In order to determine the biochemical results, their DNA was extracted and amplified by PCR with specific primer and then sequenced by PCR products and they were recorded in the NCBI database. These results definitely confirmed that the isolated strains belong to lactobacilli.

The results showed all isolated LABs were positive for hemolytic activity. LABs A and C showed beta hemolysis. LAB E showed the highest resistance to acidic environments, whereas all the our isolates were resistant to bile conditions. The supernatant obtained from lactic acid bacteria had an effect on Escherichia coli and a non-growth halo was created. But it had no effect on staph and fungi. all LAB isolates exhibited the ability of acid production and coagulation at ۴۷°C. In contrast, none of the LAB isolates presented coagulation potential at 30 °C.

Based on this study results, LAB E and C isolated from coagulated cow's milk could be considered as probiotic microorganisms considering the observed properties. They can be purified and used for the production of probiotic dairy products.

Keywords: Probiotic, Lactic acid bacteria, milk

**Corresponding author: Hamed Ahari*
Address: Department of food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
E. mail: dr.h.ahari@gmail.com