جداسازی، شناسایی و توصیف باکتری‌های اسید لاکتیک از فرآورده‌های لبنی سنتی استان مازندران

پیوند کارنما[1]، علی پاکدین پاریزی[2*]، شقایق نصر[1]

۱-گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم پایه و فناوری‌های نوین زیستی،دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران
۲-پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

چکیده

باکتری‌های اسید لاکتیک یک گروه متنوع از میکروارگانیسم‌ها می‌باشند که در صنایع لبنی و تخمیری اهمیت بسیاری دارند. غربالگری برای یافتن سویه‌های لاکتوباسیل با خصوصیات مطلوب بطور پیوسته در حال انجام است. باگسترش تولید صنعتی محصولات لبنی، امکان ازدست رفتن باکتری‌های بومی موجود درمحصولات لبنی سنتی وجود دارد، ازاین رو جداسازی، شناسایی و تعیین خصوصیات مفید این باکتری‌ها به منظور کاربردهای آتی ضروری می‌باشد. در تحقیق حاضر باکتری‌های اسید لاکتیک از فرآورده‌های لبنی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان مازندران بر روی محیط کشت اختصاصی MRS جداسازی شدند. باکتری‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی انتخاب شده و توانایی رشد این ایزوله‌ها در غلظت‌های مختلف نمک (۲ تا ۸ درصد) و همچنین توانایی تخمیر قندهای مختلف برای تمایز و شناسایی مقدماتی آنها بررسی شد. شناسایی مولکولی سویه‌های باکتری با استفاده از تکثیر و توالی‌یابی ژن 16S rRNA انجام شد. نتایج بدست آمده تنوع نسبتاً زیاد در باکتری‌های جداسازی شده از مناطق مختلف را نشان داد که در این میان دو گونه از جنس انتروکوکوس (E. faecalis و E. faesium) و یک گونه لکونوستوک (Leu. mesenteroides) خصوصیات پروبیوتیک قابل ملاحظه‌ای نشان دادند. به نظر می‌رسد محصولات لبنی سنتی استان از پتانسیل بالایی جهت جستجو برای باکتری‌های با توانایی مفید جهت استفاده در صنایع مختلف برخوردار می‌باشند.

واژه های کلیدی: باکتری اسیدلاکتیک، لاکتوباسیل، لبنیات سنتی، 16S rRNA

*مسوول مکاتبات: a.pakdin@sanru.ac.ir

۱- مقدمه

مطابق تعریفی که فدراسیون بین المللی محصولات لبنی و سازمان جهانی استاندارد در سال ۲۰۰۸ ارائه نموده است، باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)، باکتری‌های گرم مثبت، بی‌حرکت، بدون اسپور، کاتالاز منفی، احیا نیترات منفی، سیتوکروم اکسیداز منفی هستند که قادر به ذوب ژلاتین و تولید اندول نمی‌باشند. باکتری‌های اسید لاکتیک متابولیسمی تخمیری داشته و به شدت ساکارولیتیک بوده و محصول نهایی عمده حاصل از مصرف کربوهیدرات، اسید لاکتیک می‌باشد. باکتری‌های اسید لاکتیک مهم در صنعت لبنیات، متعلق به جنس‌های لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس، انتروکوکوس، پدیوکوکوس، لوکونوستوک و استرپتوکوکوس هستند(۷). انتروکوکوس‌ها در مقایسه با سایر باکتری‌های اسید لاکتیک، توزیع وسیعی در طبیعت داشته و در برابر فاکتورهای بازدارنده رشد مثل اسیدیته، نمک، خشکی، حرارت و مواد شیمیایی ضد عفونی کننده، از مقاومت بالاتری برخوردار هستند (۴). یکی از مهمترین کاربردهای LAB تولید فرآورده‌های پروبیوتیک است (۱۵). پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسمهای زنده‌ای هستند که با قرار گرفتن در محیط روده می‌توانند تعادل میکروبی را در جهت افزایش سودمندی آنها اصلاح کرده و با فعالیت خود مانع از فعالیت میکروارگانیسم‌های غیر مفید و بیماری زا شوند(۹). با توسعه صنایع لبنی در کشور و ترویج فرهنگ بهداشت مواد غذایی و احتمال آلودگی در فرآورده‌های لبنی سنتی، مصرف فرآورده‌های لبنی حاصل از این صنعت در نقاط مختلف کشور جایگزین مصرف فرآورده‌های لبنی سنتی شده و تولید این محصولات بطور چشمگیری کاهش یافته است. بنابراین برای جلوگیری از حذف تدریجی سویه‌های بومی باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسازی و حفظ آنها برای کاربردهای آتی از اهمیت بسیاری برخوردار است. در تحقیق حاضر از مناطق مختلف استان مازندران نمونه‌های لبنیات سنتی جمع‌آوری شده و پس از جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک، خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آنها تعیین و با استفاده از توالی‌یابی ژن RNA ریبوزومی شناسایی شده‌اند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه برداری و جداسازی اولیه

نمونه‌برداری ازمحصولات لبنی سنتی روستاهای استان مازندران شامل زوارده، کوهپایه‌سرا، اطاق سرا، چناربن، هتکه پشت، گلیا، موزی گله، تالار پشت، حیدر کلا و سلطان محمد انجام شد. غلظت‌های سریالی از نمونه‌ها با استفاده از محلول نمکی ۰/۸۵درصد تهیه و به منظور جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک روی محیط کشت MRS کشت داده شدند. پس از گرمخانه‌گذاری در شرایط میکروآئروفیل و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کلنی‌های تشکیل شده روی سطح محیط کشت بر اساس خصوصیات ظاهری انتخاب و به محیط کشت جدید انتقال داده شدند.

۲-۲- آزمون های بیوشیمیایی

باکتری‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی انتخاب شده و تست‌های حرکت، تولید اسپور، بررسی رشد در غلظت‌های مختلف نمک (۲ تا ۸ درصد) و بررسی رشد در دماهای مختلف (۱۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد) انجام شد.

۲-۳- آزمون تخمیر کربوهیدرات‌ها

برای بررسی توانایی مصرف کربوهیدرات ها توسط باکتری‌های منتخب از قندهای فروکتوز، مانوز، مانیتول، ساکارز، گالاکتوز، لاکتوز، ریبوز و ساکارز استفاده شد(۵).

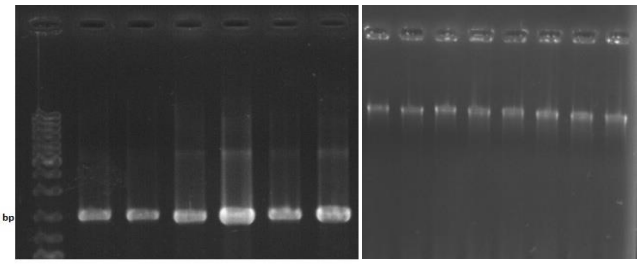
۲-۴- شناسایی مولکولی

DNA نمونه‌های باکتری با استفاده از روش CTAB (Sambrook,1989) استخراج شد. به منظور بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، از ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتری استفاده شد. واکنش PCR با پرایمرهای عمومی ژن 16Sr RNA با توالی 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' و

5'-TACCTTGTTAGGACTTCACC-3' با شرایط مرحله واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه با برنامه دمایی مرحله واسرشت سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت۹۰ ثانیه و سرانجام یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. برای تفکیک قطعات تکثیریافته از ژل آگارز یک درصد استفاده شد و به وسیله دستگاه ثبت تصویر از ژل عکسبرداری انجام گرفت. پس از اطمینان از اندازه قطعه تکثیر شده، محصول PCR جهت تعیین توالی ارسال شد. میزان شباهت توالی نوکلئویدی ژن 16Sr RNA هر باکتری با توالی‌های ثبت شده در پایگاه داده‌های نوکلئوتیدی NCBI با استفاده از ابزار BLAST بررسی و بر اساس آن شناسایی مولکولی انجام شد.

۳- نتایج و بحث

از میان باکتری‌های ظاهر شده روی محیط کشت MRS باکتری‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی جداسازی و خالص سازی شدند. هیچ‌کدام از باکتری‌های انتخاب شده توانایی تولید اسپور و حرکت را دارا نبودند. پس از استخراج DNA و انجام واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی ژن 16srRNA، محصولات PCR تعیین توالی شدند. در شکل ۱ نتایج الکتروفورز DNA استخراج شده و همچنین محصولات PCR نشان داده شده است. بر اساس نتایج توالی‌یابی دو سویه متعلق به جنس انتروکوکوس (گونه‌های E. faecalis و E. faesium) و یک ایزوله متعلق به جنس لوکونوستوک (Leu. mesenteroides) بود. جنس انتروکوکوس دارای گونه‌های بسیار زیادی می‌باشد، اما دو گونه E. faesium که عمدتاً بعنوان پروبیوتیک حیوانی استفاده می‌شود (هرچند دارای مصارف انسانی نیز می‌باشد) و E. faecalis که پروبیوتیک انسانی است، از اهمیت بسیاری برخوردار می‌باشند (۱۰). این دو گونه از محصولات لبنی مختلف (۱۲ و ۱) و همچنین محصولات تخمیری مانند سوسیس جداسازی شده‌اند (۱۳). از سویه‌های مختلف E. faesium بدلیل اینکه باعث تولید طعم نامطلوب در گوشت نمی‌شوند بعنوان کشت‌های استارتر استفاده می‌شود (۳). جنس لوکونوستوک نیز از جنس‌های مهم باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد که از محصولات بسیاری جداسازی شده و بعنوان استارتر در تهیه محصولات لبنی استفاده می‌شود (۸ و ۱۶). باکتری‌های متعلق به جنس انتروکوکوس در هر دو دمای ۱۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد بخوبی رشد کردند، اما باکتری لوکونوستوک قادر به رشد در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد نبود. باکتری‌های پروبیوتیک جداسازی شده از نظر توانایی رشد در غلظت‌های نمک نیز با هم تفاوت داشتند (جدول ۱). از میان باکتری‌های مورد بررسی E. faesium نسبت به سایر باکتری‌ها از تحمل کمتری به نمک برخوردار بود و تنها در محیط حاوی تا ۴ درصد نمک قادر به رشد بود درحالیکه سایر باکتری‌ها در محیط دارای ۶ درصد نمک نیز بخوبی رشد کردند. دو گونه انتروکوکوس در توانایی تخمیر قندهای مختلف نیز با هم تفاوت داشتند، بنحویکه سویه E. faecalis جداسازی شده قادر به تخمیر ساکارز و مانیتول نبود. در جدول ۲ توانایی تخمیر قندهای مختلف توسط سویه‌های باکتری جداسازی شده نشان داده شده است.



شکل ۱- الکتروفورز DNA استخراج شده از سویه‌های مختلف باکتری (سمت راست) و محصول PCR حاصل از تکثیر ژن 16srRNA با استفاده از آغازگرهای عمومی (سمت چپ)

جدول ۱- بررسی توانایی رشد باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی مازندران در غلظت‌های مختلف نمک و دماهای مختلف

سویه باکتری	رشد در مقادیر مختلف نمک (درصد)					رشد در دماهای مختلف (درجه سانتی‌گراد)	
	۲	۴	۶	۸		۱۵	۴۰
Enterococcus faecalis	+	+	+	−		+	+
Enterococcus faesium	+	+	−	−		+	+
Leuconostoc mesenteroides	+	+	+	−		−	+

جدول ۲- توانایی مصرف کربوهیدرات‌های مختلف توسط سویه‌های باکتری اسید لاکتیک جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی مازندران

سویه باکتری	گلوکز	گالاکتوز	ساکارز	فروکتوز	مانوز	لاکتوز	ریبوز	مانیتول
Entrococcus faecalis	+	+	−	+	+	+	+	−
Entrococcus faesium	+	+	+	+	+	+	+	+
Leuconostoc mesenteroides	+	+	+	+	+	+	+	−

در تحقیقات متعددی فلور باکتری‌های اسیدلاکتیک محصولات لبنی مورد بررسی قرار گرفته است. باکتری های L.paracasei, L.fermentum,L.plantarum L.acidophisus, از نمونه های محصول لبنی سنتی کنیایی به نام Kule naoto که pH آن کمتر از ۴/۵ است جداسازی شده است (۱۱). باکتری L. delbrukii ssp bulgaricus از نمونه‌های ماست سنتی جداسازی شده که دارای ویژگی‌های خاص تجاری می‌باشد (۲). Rosseti و همکاران در سال ۲۰۰۸ در شمال ایتالیا از نمونه های پنیر سنتی به نام Grana padano دو گونه از لاکتوباسیل ها و یک گونه استرپتوکوک را به صورت غالب جدا نموده اند. این باکتری ها شامل L.helveticus L. delbrukii lactis Streptococcus thermophillus, بودند. باکتری E. faecalis دارای کاربرد روزافزون در تولید صنعتی پروبیوتیک‌های دامی می‌باشد. از این باکتری در تولید برخی انواع پرطرفدار پنیر اروپایی نیز بطور گسترده استفاده می‌شود (۱۴). باکتری‌های گروه Leuconostoc نیز کاربردهای فراوانی در تولید صنعتی و سنتی محصولات گیاهی تخمیری بویژه در کشورهای اروپایی دارند(۶).

۴- نتیجه‌گیری

دستیابی به سویه های بومی، شناسایی آنها و به کارگیری صنعتی یافته‌ها می‌تواند بخش بسیار بزرگی از هزینه‌های صنایع داخلی را کاهش دهد. در عین حال به کارگیری ایزوله‌های بومی بدست آمده با توجه به علاقه ندی عمومی به طعم محصولات لبنی سنتی می‌تواند علاوه بر کاهش هزینه تولید، استقبال عمومی از محصولات تولیدی را نیز افزایش دهد.

۵- منابع

1- Ayad, E. H. E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H., and El-Soda, M. 2004. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. Food microbiology, 21(6), 715-725.

2- Ayhan, K., Durlu-ozkaya, F., and Tunail, N. 2005. Commercially important characteristics of Turkish origin domestic strains of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus. International Journal of Dairy Technology, 58: 150-157.

3- Callewaert, R., Hugas, M., and De Vuyst, L. 2000. Competitiveness and bacteriocin production of Enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 57(1-2), 33-42.

4- Franz, C. M. A. P., Abriouel, H., Holzapfel, W. H., and Gálvez, A. 2002. Of enterococci and food. Australasian Biotechnology, 12(1), 31-37.

5- Garrity, G., Boone, M., David, R. and Richard, W. 2004. Bergy,s manual of systemstic bacteriology. 4th Ed. Springer pub. Michigan.

6- Hejazi M. Lactic Acid Bacteria and Functional Foods. 2010. Proceedings of 1st National conference on Probiotics and Functional foods; 173-175.

7- Juneja, V. K., Goktepe, I., and Ahmedna, M. 2005. Probiotics in food safety and human health. CRC Press.

8- Katla, A. K., Kruse, H., Johnsen, G., and Herikstad, H. 2001. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. International journal of food microbiology, 67(1-2), 147-152.

9- Klaenhammer, T. R. 2000. Probiotic bacteria: today and tomorrow. Journal of Nutrition, 130: 415- 416.

10- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., and Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International journal of food microbiology, 41(2), 103-125.

11- Mathara, J. M., Schillinger, U., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., and Holzapfel, W. H. 2004. Isolation, identification and characterization of the dominant microorganisms of kule naoto: The Maasai traditional fermented milk in Kenya. International Journal of Food Microbiology, 94: 269-278.

12- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., and Lodi, R. 2006. Technological and molecular characterization of enterococci isolated from north–west Italian dairy products. International Dairy Journal, 16(8), 867-875.

13- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., and Kotzekidou, P. 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat science, 65(2), 859-867.

14- Rossetti, L., Fornasari, M. E., Gatti, M., Lazzi, C., Neviani, E., and Girraffa, G. 2008. Grana Padano cheese whey starters: microbial composition and strain distribution. International Journal of Food Microbiology, 127: 168-171.

15- Salminen, S., and Von Wright, A. 2004. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. CRC Press.

16- Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., and De Vuyst, L. 2006. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. Systematic and applied microbiology, 29(6), 487-495.