جداسازی و غربال‌گری باکتری‌های تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید از محصولات لبنی بومی استان کرمان و شناسایی مولکولی آنها

زهرا خدایی جلال‌آبادی[1]، شهلا سلطانی نژاد [*2]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد جیرفت، دانشگاه آزاد اسلامی، جیرفت، ایران

[*]نویسنده مسئول: *Soltanibiotech@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۲

چکیده

اگزوپلی‌ساکاریدهای تولیدی توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک در بهبود خواص حسی و بافتی محصولات لبنی تخمیری نقش مهمی ایفا می‌کنند. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید از محصولات لبنی بومی استان کرمان می‌باشد. نمونه‌های محصولات لبنی سنتی در شرایط استریل جمع‌آوری شده و مستقیماً روی محیط ام.آر.اس آگار کشت داده شد. پس از خالص‌سازی و بررسی خصوصیات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی، ۲۰ جدایه انتخاب گردیده و تولید اگزوپلی‌ساکارید، با روش فنل/سولفوریک اسید اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست آمده با منحنی استاندارد گلوکز مقایسه و میزان تولید بر حسب میلی‌گرم بر لیتر تعیین گردید. الگوی تولید اگزوپلی‌ساکارید با الگوی رشد باکتری‌ها و نیز اثرات تغییرات دما و اسیدیته بر میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید بررسی شد. در نهایت جدایه‌های M-2 و M-26 به‌عنوان برترین جدایه‌ها انتخاب و به‌روش مولکولی شناسایی شدند. سپس اگزوپلی‌ساکارید تولید شده، استخراج گردیده و فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها به‌روش انتشار در آگار بررسی شد. نتایج نشان داد که ۲۰ جدایه مورد بررسی هر دو نوع اگزوپلی‌ساکارید را تولید نموده، دو جدایه M-2 و M-26 که بیشترین میزان تولید را داشتند، به‌ترتیب متعلق به *لکونوستوک مزنتروئیدس* و *انتروکوکوس فاسیوم* می‌باشند. تولید اگزوپلی‌ساکاریدها در برابر تغییرات اسیدیته از ۶/۵ تا ۸ و تغییرات دمایی ۴۲-۲۵ درجه سلسیوس بررسی شده که بیشترین مقدار تولید اگزوپلی‌ساکارید در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و اسیدیته ۷/۵، در انتهای فاز لگاریتمی رشد گزارش شد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که پتانسیل تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط گونه‌های بومی استان کرمان وجود دارد.

واژگان کلیدی: لبنیات محلی، اگزوپلی‌ساکارید، *انتروکوکوس فاسیوم*، *لکونوستوک مزنتروئیدس*

مقدمه

از نیمه دوم قرن حاضر استفاده هوشمندانه از میکروارگانیسم‌ها منجر به تولید صنعتی مواد متعددی مانند حلال‌ها، آنزیم‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و پلی‌ساکاریدها شده است. اگزوپلی‌ساکاریدها، پلی‌ساکاریدهای بلند زنجیره‌ای از واحدهای تکرارشونده قندی و غیرقندی هستند که شاخه‌دار نیز می‌باشند. واحدهای قندی عمدتاً گلوکز، گالاکتوز و رامنوز هستند (مرسلی،۱۳۸۷). پلی‌ساکاریدهای میکروبی ترکیبات برون‌ریزی هستند که از سلول به بیرون ترشح می‌شوند و مقدار و ساختمان شیمیایی آن‌ها بستگی به نوع میکروارگانیسم تولیدکننده و سوبسترای کربنی دارد که در اختیار آنان قرار می‌گیرد که یا به‌صورت کپسول با دیواره سلولی ارتباط دارند، یا به‌صورت اسلایم به محیط خارج ترشح می‌شوند (Pawar et al., 2017). پلی‌ساکاریدها بر اساس موقعیت خود نسبت به سلول دسته‌بندی می‌شوند. برخی از آن‌ها به‌صورت داخل سلولی در سیتوزول قرار گرفته‌اند و به‌عنوان منبع کربن یا انرژی مطرح می‌باشند. گروه دوم به‌عنوان اجزای دیواره سلولی نظیر پپتیدوگلیکان و تایکوئیک اسید شناخته می‌شوند. گروه سوم آن‌هایی هستند که در خارج از دیواره سلولی واقع می‌گردند. به‌علت خواص فیزیکی و شیمیایی آن‌ها، به‌طور گسترده در صنایع غذایی به‌عنوان عوامل ویسکوزیته‌کننده، ژله‌ای‌کننده و قوام‌دهنده استفاده می‌شوند (Singha, 2012; Czacyzk and Myszka, 2007). این ترکیبات در طی مراحل رشد میکروبی در محیط رها می‌شوند و از آن‌جا که متصل به سطح سلول میکروبی نیستند،

می‌توان آن‌ها را از پلی‌ساکاریدهای کپسوله شده که متصل به سطح سلول هستند، متمایز کرد. اگزوپلی‌ساکاریدهای میکروبی در دو گروه هموپلی‌ساکاریدها و هتروپلی‌ساکاریدها قرار می‌گیرند (Wang et al., 2015). باکتری‌های اسید لاکتیک به‌عنوان باکتری‌های بی‌ضرر شناخته می‌شوند و با تخمیر و تولید مواد اسیدی مثل اسیدلاکتیک و در نتیجه کاهش اسیدیته نقش مهمی به‌عنوان عامل نگهدارنده مواد غذایی دارند (Frengova et al., 2002). باکتری‌های اسید لاکتیک شامل گروه بزرگی از باکتری‌های گرم مثبت، کاتالاز و اکسیداز منفی هستند. این باکتری‌ها با تخمیر کربوهیدرات‌ها، اسید لاکتیک تولید کرده، بی‌هوازی اجباری یا بی‌هوازی اختیاری هستند و نیازهای غذایی پیچیده‌ای دارند. مهم‌ترین جنس‌های این باکتری‌ها شامل *لاکتوکوکوس*[1]، *استرپتوکوکوس*[2]، *انتروکوکوس*[3]، *لاکتوباسیلوس*[4] و *اسپورولاکتوباسیلوس*[5] می‌باشد که منبع باکتری‌های اسید لاکتیک عمدتاً لبنیات است (خدابخش و همکاران۱۳۹۲، De man et al., 1960; Tallon et al., 2003). هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید از محصولات لبنی بومی استان کرمان و بررسی میزان تولید اگزوپلی‌ساکاریدهای متصل و آزاد شده می‌باشد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه و جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک

دستیابی به مناطقی که محصولات لبنی بومی در آن حفظ شده باشد، از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. بنابراین برای نمونه‌برداری، مناطقی انتخاب گردید که کاملاً بکر باشند. در فروردین ماه ۱۳۹۵ فراورده‌های لبنی بومی (ماست، شیر، پنیر، کشک و اسپار) از روستاهای ماهان، لنگر، شهربابک، زرند، راین، لاله‌زار، باغین، راور، بافت و رابر در استان کرمان جمع‌آوری و نمونه‌ها در شرایط استریل روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. در ابتدا ۵ گرم از هر نمونه در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی استریل به‌صورت همگن درآمد. سپس رقت‌های 10^{-1} – 10^{-6} از هر نمونه فراهم شده، جهت جداسازی سویه‌های پروبیوتیک در محیط کشت ام.آر.اس[6] آگارکشت داده شد (خدابخش و همکاران، ۱۳۹۲; Tallon et al ., 2003). پس از گرم‌خانه‌گذاری در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۷۲ ساعت، کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت از نظر خواص مورفولوژی و میکروسکوپی بررسی شدند. از کلونی‌های رشد کرده، کشت مجدد به‌عمل آمده تا این‌که کشت‌های خالصی بدست آید. از نمونه‌های خالص تشکیل شده بر روی محیط کشت، لام میکروسکوپی به روش رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز تهیه شد (خدابخش و همکاران، ۱۳۹۲ ,. Tallon et al 2003; Alhudhud et al., 2014;). در ادامه۲۰ جدایه جهت بررسی بیشتر انتخاب گردید.

غربال‌گری جدایه‌های تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید

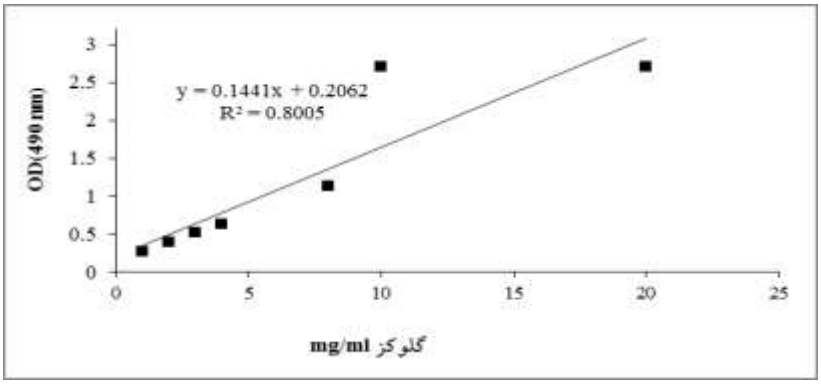
در این بررسی اگزوپلی‌ساکارید متصل به سلول و اگزوپلی‌ساکارید ترشح شده به‌طور جداگانه استخراج و در مقایسه با منحنی استاندارد گلوکز تعیین مقدار شدند (Tallon et al ., 2003). به این منظور کشت یک شبه هر جدایه به میزان ۱ درصد به محیط ام.آر.اس براث تلقیح و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس محیط‌های کشت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ (۱۵۰۰۰ g) شدند. مایع رویی برای جداسازی اگزوپلی‌ساکارید رها شده در محیط کشت و ته‌نشست برای جداسازی اگزوپلی‌ساکارید باند شده، استفاده گردید. برای

[1] *Lactococcus*
[2] *Streptococcus*
[3] *Enterococcus*
[4] *Lactobacillus*
[5] *Sporolactobacillus*
[6] de Man, Rogosa and Sharp (MRS)

جداسازی اگزوپلی‌ساکارید باند شده به سلول، به ته‌نشست حاوی سلول‌های باکتریایی، ۵ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی برای شستشو اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (g ×۱۵۰۰۰) گردید. ته‌نشست دو بار در ۵ میلی‌لیتر EDTA[1]، (۰/۰۵ مولار)، سوسپانسیون شده و ۴ ساعت در انکوباتور شیکردار گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس به‌منظور جداکردن مواد نامحلول، سوسپانسیون در g ۶۰۰۰ به‌مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. به‌منظور رسوب اگزوپلی‌ساکارید باندشده، به مایع شفاف رویی حاصل از سانتریفیوژ، اتانل سرد اضافه شد. عمل رسوب‌سازی اگزوپلی‌ساکارید باند شده به‌مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. برای جداسازی اگزوپلی‌ساکارید رسوب یافته، از سانتریفیوژ با دور g ۶۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد. در این مرحله مایع شفاف رویی دور ریخته شد و ته‌نشست حاوی اگزوپلی‌ساکارید باند شده، در محیط آزمایشگاه خشک شد. به‌منظور اطمینان از نتایج تمام آزمایشات ۳ بار تکرار گردید (خدابخش و همکاران، ۱۳۹۲ ;Tallon et al ., 2003).

سنجش اگزوپلی‌ساکارید باند شده با اسپکتروفتومتری

رسوب حاصل از مرحله قبل، در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و مقدار کربوهیدرات کل از طریق روش فنل/ اسیدسولفوریک و گلوکز به‌عنوان استاندارد تعیین شد. در این روش روی ۰/۵ میلی‌لیتر ته‌نشست حاوی اگزوپلی‌ساکارید محلول در آب مقطر، ۰/۵ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ ریخته شد. محلول ورتکس شده و پس از آن‌که دمای آن به دمای اتاق رسید، با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومترجذب آنها خوانده شد. با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز انتخاب برترین سویه تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید باندشده انجام گرفت (شکل ۱). جهت تهیه محلول استوک گلوکز، ۱۰ میلی‌گرم آلفا- دی گلوکز در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول استوک گلوکز تهیه گردید. پس از افزودن غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۸ و ۱۰ میلی‌لیتر از محلول استوک گلوکز به بشرهای مختلف، با آب مقطر حجم محلول نهایی به ۲۰ میلی‌لیتر رسید. از هر بشر ۰/۵ میلی‌لیتر محلول با سمپلر برداشته، داخل لوله آزمایش ریخته و به هر لوله ۰/۵ میلی‌لیتر فنل و ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ اضافه گردید. پس از ورتکس و رسیدن محلول به دمای محیط، جذب نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد (خدابخش و همکاران، ۱۳۹۲ ,. Tallon et al ;2003).



شکل ۱- منحنی استاندارد گلوکز

جداسازی و شناسایی اگزوپلی‌ساکارید رهاشده در محیط

برای جداسازی اگزوپلی‌ساکاریدهای آزاد شده در محیط کشت، مایع‌رویی به‌دست آمده از ۱۰ میلی‌لیتر نمونه سانتریفیوژ و سپس با تری‌کلرواستیک اسید با غلظت ۲۰ درصد عمل‌آوری شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت در انکوباتور شیکردار گرم‌خانه‌گذاری گردید. در طی این مدت با یک همزن به‌آرامی هم‌زده شد. پروتئین‌های ته‌نشین شده پس از ۲۰ دقیقه از طریق سانتریفیوژ (۲۵۰۰۰g) جدا گردید. سپس به‌منظور رسوب اگزوپلی‌ساکارید باند شده، به مایع شفاف رویی حاصل از سانتریفیوژ، اتانل سرد اضافه شد. عمل رسوب‌سازی اگزوپلی‌ساکارید باند شده به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. برای جداسازی اگزوپلی‌ساکارید رسوب یافته، از سانتریفیوژ با دور g ۶۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد. ته نشست حاوی اگزوپلی‌ساکارید رها شده در محیط، پس از خشک‌شدن در محیط آزمایشگاهی برای سنجش با روش فنل/ اسیدسولفوریک در آب مقطر حل گردید (خدابخش و همکاران، ۱۳۹۲؛ Tallon et al., 2003).

اگزوپلی‌ساکاریدهای رهاشده در محیط طبق روشی که برای اگزوپلی‌ساکارید باند شده توضیح داده شد، سنجش گردید.

تعیین الگوی رشد جدایه‌های منتخب

برای تعیین الگوی رشد، جدایه‌های منتخب در۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت ام.آر.اس براث کشت داده شد. در فواصل زمانی معین هر ۶ ساعت نمونه‌برداری صورت گرفت و جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب الگوی رشدی جدایه‌های مورد بررسی در زمان‌های مختلف تعیین گردید (خدابخش و همکاران، ۱۳۹۲؛ Tallon et al., 2003).

تعیین الگوی تولید اگزوپلی‌ساکارید

برای تعیین الگوی تولید اگزوپلی‌ساکارید، هم‌زمان با تعیین الگوی رشد باکتری مورد نظر در ساعت‌های متوالی، ۲ میلی‌لیتر از نمونه‌ها را در هر ساعت جمع‌آوری نموده و سپس با روش فنل/ سولفوریک‌اسید مقدار اگزوپلی‌ساکارید تولید شده در هر ساعت تعیین و به کمک منحنی استاندارد گلوکز میزان کربوهیدرات تولید شده در هر ساعت اندازه‌گیری شد. به کمک نرم‌افزار Excel منحنی مربوط به الگوی تولید اگزوپلی ساکارید رسم گردید (خدابخش و همکاران، ۱۳۹۲).

بررسی اثر ضدباکتریایی جدایه‌های منتخب

جهت بررسی اثر ضدباکتریایی، از روش انتشار در آگار به‌کمک دیسک استفاده گردید. به این منظور از سوسپانسیون ۲۴ ساعته سویه‌های اندیکاتور (باکتری‌های گرم مثبت: *لیستریا منوسیتوژنز* ATCC7644، *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC1431، *باسیلوس سرئوس*PTCC1015 و باکتری‌های گرم منفی: *سالمونلا انتریکا* PTCC1709، *ایشریشیا کولی* PTCC1270 و *سودوموناس آئروژینوزا* (CZO) به‌وسیله سواب، کشت چمنی روی محیط مولر هینتون آگار داده شد. سپس دیسک‌های کاغذی استریل روی سطح محیط‌های کشت با فواصل منظم قرار گرفت. در ادامه دیسک‌ها به حجم‌های ۵۰،۲۵ و ۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه های منتخب آغشته گردیده، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت، پیدایش یا عدم پیدایش هاله‌های عدم رشد بررسی گردید. این آزمایش سه مرتبه تکرار شد و میانگین قطر هاله‌های عدم رشد در نظر گرفته شد (Schillinger and Luck,1989; Nissen-Meyer et al., 2009; Settanni et al., 2005; Arnesen et al., 2008).

بررسی اثر عوامل محیطی دما و اسیدیته بر میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید

تأثیر دما بر تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط دو جدایه منتخب M-2 و M-26 در ۴ دمای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. قبل از انجام هر آزمون سویه‌های مورد نظر در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد روی محیط ام .آر.اس آگار به مدت ۴۸-۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس از نمونه‌های کشت داده شده، دو لوپ پر به محیط ام. آر.اس براث منتقل کرده و برای هر نمونه ۴ فالکون در ۴ انکوباتور با دماهای متفاوت قرار داده شد. پس از گذشت سه روز با روش فنل/سولفوریک اسید، جذب نمونه‌ها در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. سپس بر اساس معادله منحنی استاندارد گلوکز میزان اگزوپلی‌ساکارید بر حسب میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد. در هر انکوباتور یک فالکون به‌عنوان کنترل یا شاهد در نظر گرفته شد که محیط کشت فاقد باکتری بود (Singha, 2012). به‌منظور بررسی اثر اسیدیته بر میزان تولید اگزوپلی ساکارید، مطابق بررسی اثر دما برای ۲ جدایه منتخب، به محیط‌های ام. آر .اس براث که اسیدیته آنها ۶/۵، ۷، ۷/۵ و ۸ تنظیم شده بود، از سویه‌های مربوطه منتقل کرده، پس از ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، با روش فنل/ سولفوریک جذب نمونه‌ها در ۴۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شده و مقدار تولید اگزوپلی ساکارید در اسیدیته‌های مختلف اندازه‌گیری گردید (خانی و همکاران، ۱۳۹۴ ;Li et al., 2016).

شناسایی مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی جدایه‌های منتخب

از تست‌های اولیه شامل رنگ‌آمیزی گرم، شکل میکروسکوپی، شکل و رنگ کلونی، کاتالاز، اکسیداز و همولیز استفاده شد. جهت شناسایی مولکولی، DNA ژنومی به کمک کیت استخراج DNA، Accu Prep (Bioneer، ساخت کشور کره جنوبی، Cat. No: K-3032) استخراج گردید. دو پرایمر مورد استفاده برای تکثیر ژن ۱۶srRNA: عبارتند از۸F با توالی ´5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-´3 و ۱۵۴۱R با توالی ´5-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-´3. برنامه PCR با ۳۰ چرخه تکثیر در دستگاه ترموسایکلر(اپن‌دورف، آلمان) به این شکل انجام شد: جداسازی اولیه دو رشته در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، باز شدن دو رشته در دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۶ درجه به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن رشته هدف در ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه و مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه. محصول PCR به‌وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد (مرک، آلمان) جداسازی شده و به‌وسیله اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. توالی ژن‌ها توسط شرکت بیونیرکره جنوبی تعیین گردید. این توالی‌ها توسط نرم‌افزارهای مختلف از جمله Finch TV، BioEdit، Gene Runner و ..... تجزیه و تحلیل شد. نتایج حاصل از بلاست توالی‌های مورد نظر در سایت‌های[1] NCBI و EBI[2] بررسی شده و توسط نرم‌افزار MEGA5 تحلیل گردید. درخت فیلوژنی به‌روش Neighbor joining ترسیم شده، در نهایت توالی ژن‌ها توسط نرم‌افزار sequin در بانک ژن ثبت گشت.

نتایج

جداسازی و خالص‌سازی سویه‌های تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید

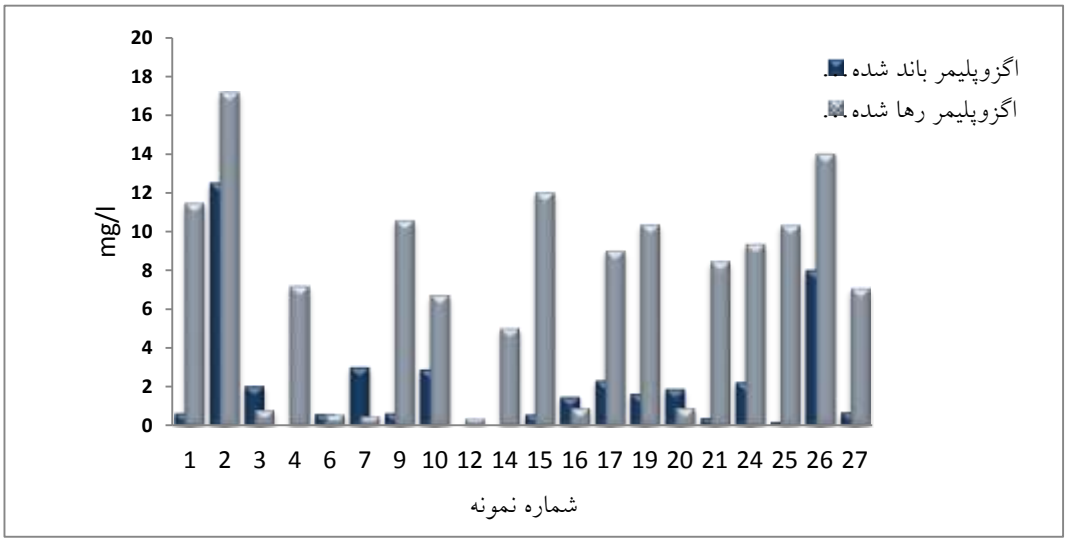
از ۴۶ نمونه مورد بررسی، ۲۰ جدایه خالص‌شده انتخاب گردید. رنگ کلونی‌ها سفید، از نظر شکل به‌صورت اجتماعی از کوکسی‌ها، زنجیره‌ای، دوتایی، بدون

[1] http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
[2] http://www.ebi.ac.uk

حرکت، کاتالاز و اکسیداز منفی و از نظر همولیز دارای همولیز آلفا و نیز گرم مثبت می‌باشند.

اندازه‌گیری میزان اگزوپلی‌ساکاریدهای باند شده به سلول باکتریایی و رها شده در محیط

از ۲۰ جدایه مورد بررسی بیشترین میزان اگزوپلی‌ساکارید باند شده مربوط به نمونه M-2 و سپس M-26 که به ترتیب مقدار ۸/۵،۱۲/۵ و بازه تولید اگزوپلی‌ساکارید باند شده (۱۲/۵-۰/۰۳) میلی‌گرم بر لیتر گزارش گردید. در مورد اگزوپلی‌ساکارید رها شده، بیشترین مقدار مربوط به جدایه‌های شماره M-2 و M-26، که نمونه M-2، ۱۷/۱۶ میلی‌گرم بر لیتر و M-26، ۱۴ میلی‌گرم بر لیتر و بازه تولید اگزوپلی‌ساکارید رها شده، (۱۷/۱۶-۰/۳۵) میلی‌گرم بر لیتر گزارش گردید (نمودار۱).



نمودار ۱- مقایسه اگزوپلی‌ساکارید رها شده و باند شده

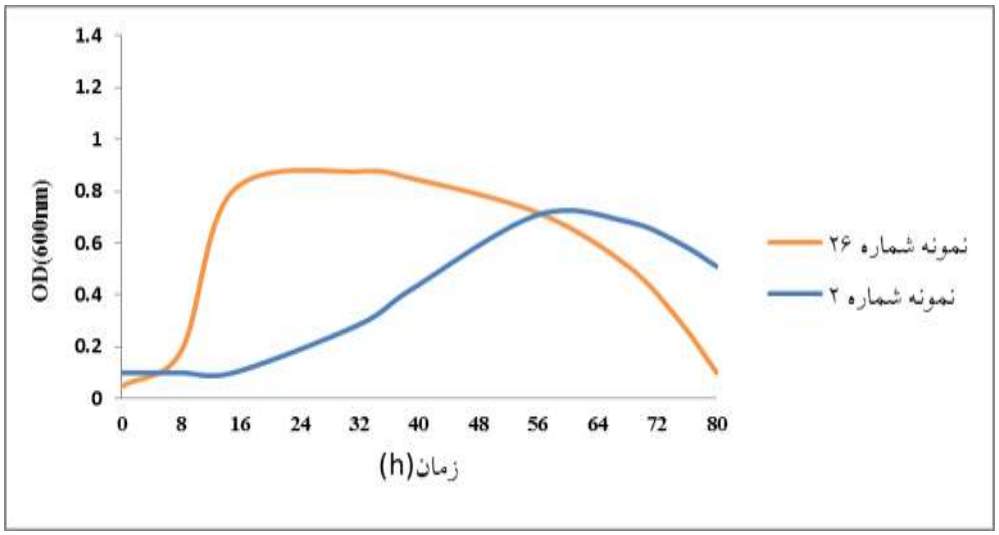
مقایسه شکل ظاهری اگزوپلی‌ساکارید باند شده و رها شده

در بررسی شکل ظاهری اگزوپلی‌ساکاریدها تفاوت بارزی مشاهده شد، به‌طوری که اگزوپلی‌ساکارید باند شده سفید رنگ، دارای دانه‌های بلوری ریز و جدا جدا از هم بوده، در حالی‌که نمونه رها شده قهوه‌ای رنگ، چسبنده و کش‌دار بود (شکل ۲)

شکل ۲- مقایسه شکل ظاهری دو اگزوپلی‌ساکارید (باند شده سمت راست و رها شده سمت چپ)

تعیین الگوی رشد جدایه‌های منتخب

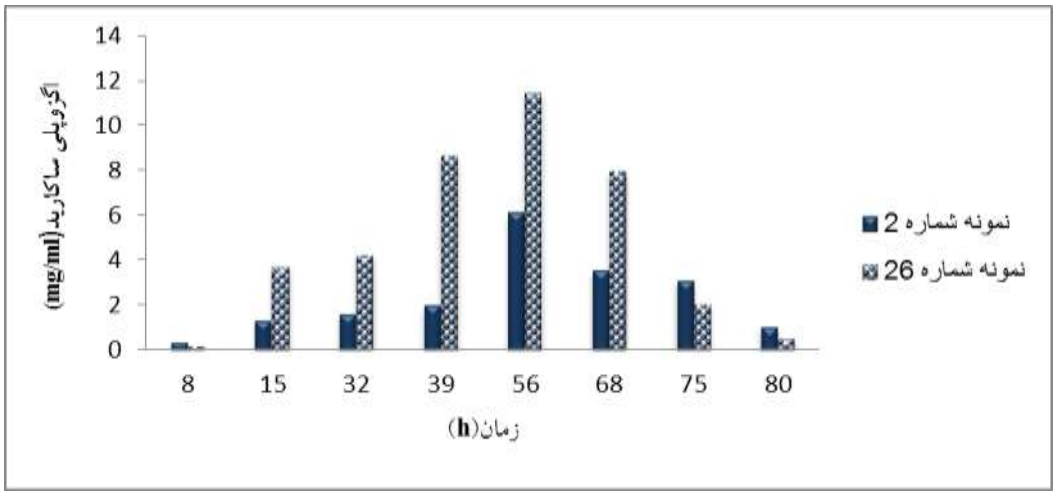
برای تعیین الگوی رشد جدایه‌های منتخب، از کشت ۲۴ ساعته هر جدایه، چند لوپ به ارلن‌های واجد ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط ام .آر.اس براث انتقال داده و سپس در فواصل زمانی معین (صبح و عصر)، جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد (نمودار ۲).



نمودار۲- تعیین الگوی رشد جدایه‌های منتخب

تعیین الگوی تولید اگزوپلی‌ساکارید

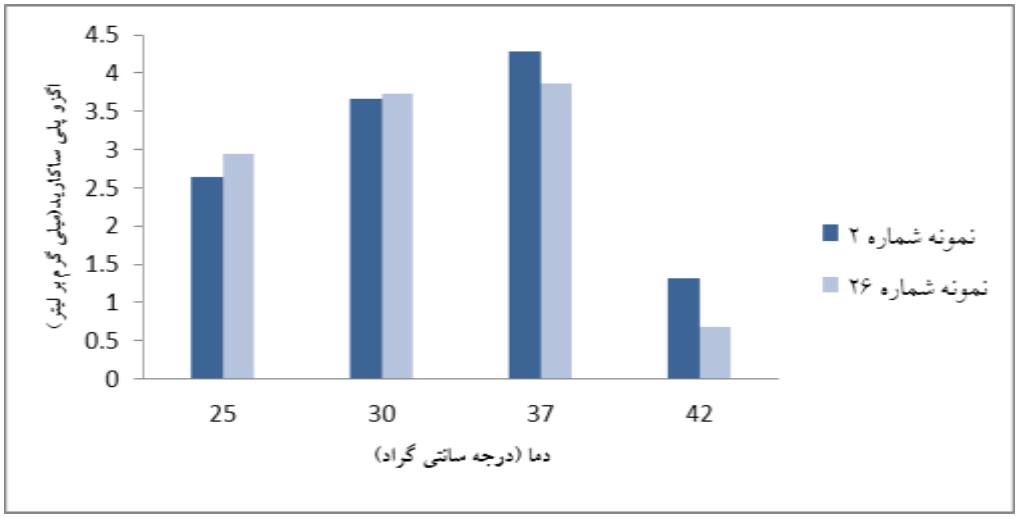
برای تعیین الگوی تولید اگزوپلی‌ساکارید همزمان با تعیین الگوی رشد باکتری مورد نظر، به کمک روش فنل/سولفوریک اسید مقدار اگزوپلی‌ساکارید تولید شده اندازه‌گیری شد. سویه‌های منتخب (M-2 و M-26) بیشترین تولید اگزوپلی‌ساکارید را در انتهای فاز لگاریتمی رشد باکتری و ابتدای فاز سکون رشد داشته و پس از آن میزان تولید کاهش یافته است. در زمان ۵۶ بیشترین مقدار تولید وجود داشت (نمودار ۳).



نمودار ۳- الگوی تولید اگزوپلی‌ساکارید

تأثیر دما بر میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید

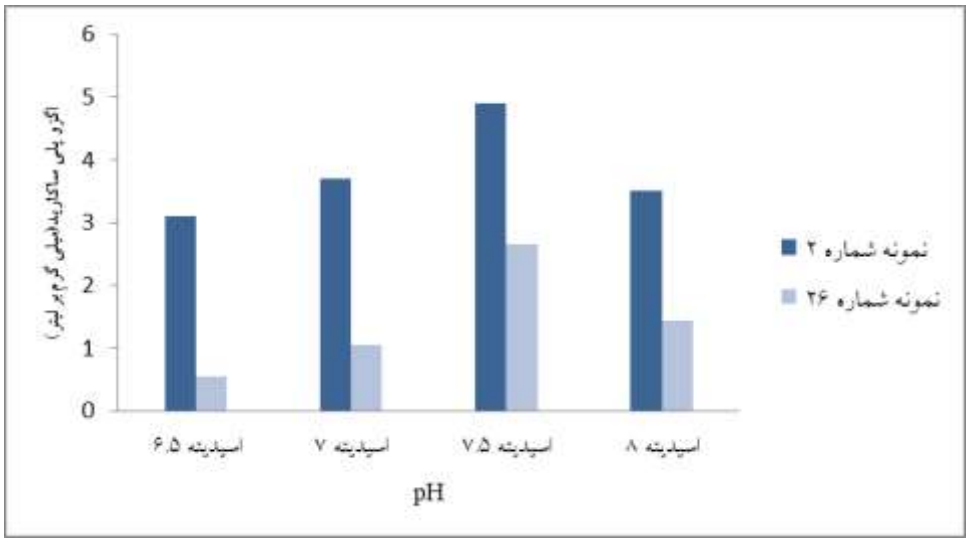
اثر چهار دمای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد بر تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط دو جدایه مورد نظر با روش فنل/سولفوریک اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان تولید در بازه دمایی(۳۷-۳۰) درجه سانتی‌گراد و کمترین میزان در دمای ۴۲ درجه گزارش شد (نمودار ۴).



نمودار ۴- اثر تغییرات دما بر میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید

تأثیر اسیدیته بر میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید

اثر ۴ اسیدیته ۶/۵، ۷، ۷/۵ و ۸ بر جدایه‌های منتخب بررسی گردید و میزان اگزوپلی‌ساکارید تولیدشده با روش فنل/سولفوریک اسید و معادله منحنی استاندارد گلوکز اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان تولید در اسیدیته ۷/۵ و کمترین مقدار در اسیدیته ۶/۵ گزارش گردید (نمودار ۵).



نمودار ۵- اثر تغییرات اسیدیته بر میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید

بررسی فعالیت ضدباکتریایی جدایه‌های منتخب

نتایج فعالیت ضدباکتریایی اگزوپلی‌ساکارید دو جدایه M-2 و M-26 در حجم‌های مختلف ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرولیتر بر علیه سویه‌های اندیکاتور در جداول ۱ و ۲ بیان شده است. در مورد جدایه M-26 بیشترین تأثیر ضدباکتریایی در بین سویه‌های گرم مثبت مربوط به باسیلوس *سرئوس* و کم‌ترین اثر ضدباکتریایی برعلیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد. جدایه M-2 بیشترین تأثیر ضدباکتریایی را برعلیه *باسیلوس سرئوس* و سپس *لیستریا مونوسیتوژنز* داشت و نیز بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری‌های گرم منفی اثری نداشت. نتایج نشان می‌دهد که هیچ‌کدام از جدایه‌های منتخب روی *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* اثر نداشته، ولی تأثیر خوبی روی *باسیلوس سرئوس* گذاشته‌اند (Nascimento et al., 2010; Chen et al., 2007).

جدول۱- میانگین قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) باکتری‌های اندیکاتور تحت‌تأثیر اگزوپلی‌ساکارید سویه M-2

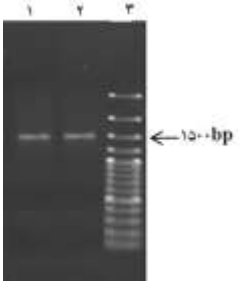
میکروارگانیسم	۲۵ µl	۵۰ µl	۷۵ µl
لیستریا مونوسیتوژنز	۱۷±۰/۵	۱۸±۰/۷۶۳	۲۲±۰/۲۸۸
باسیلوس سرئوس	۲۳±۰/۲۸۸	۲۵±۰/۲۸۸	۲۹±۰/۲۸۸
سالمونلا انتریکا	۰±۰	۰±۰	۰±۰
اشریشیا کلی	۰±۰	۰±۰	۰±۰
سودوموناس آئروژینوزا	۰±۰	۰±۰	۰±۰
استافیلوکوکوس اورئوس	۰±۰	۰±۰	۰±۰

جدول۲- میانگین قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) باکتری‌های اندیکاتور تحت‌تأثیر اگزوپلی‌ساکارید سویه M-26

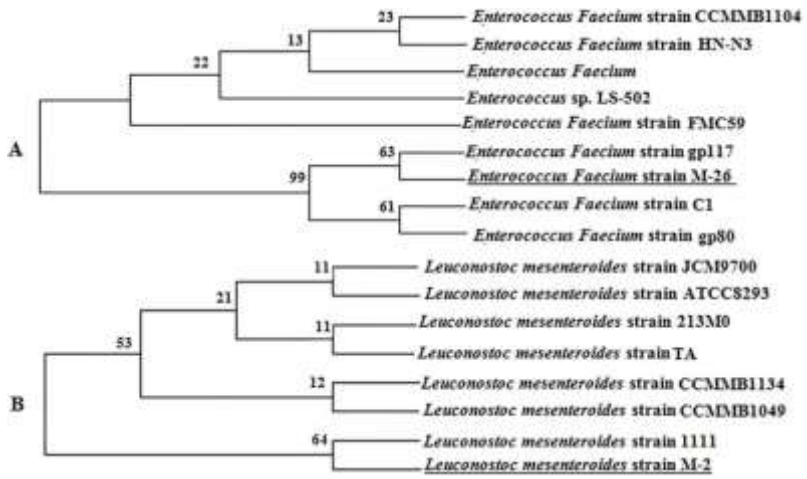
میکروارگانیسم	۲۵ µl	۵۰ µl	۷۵ µl
لیستریا مونوسیتوژنز	۱۶±۰/۵۷۷	۲۰±۰/۲۸۸	۲۱±۰/۲۸۸
باسیلوس سرئوس	۱۸±۰/۵۷۷	۲۰±۰/۵	۳۶±۰/۵۷۷
سالمونلا انتریکا	۰±۰	۱۵±۰/۷۶۳	۱۷±۰/۲۸۸
اشریشیا کلی	۰±۰	۰±۰	۰±۰
سودوموناس آئروژینوزا	۰±۰	۰±۰	۰±۰
استافیلوکوکوس اورئوس	۰±۰	۱۶±۰/۲۸۸	۱۸±۰/۵۷۷

نتایج شناسایی مولکولی

وابستگی فیلوژنتیکی جدایه‌های ایزوله شده، بوسیلهٔ آنالیز توالی ژن ۱۶S rRNAمشخص گردید. طول کامل این ژن حدود ۱۵۰۰ جفت باز تعیین توالی شده (شکل ۳) و درخت فیلوژنی رسم شد. شکل ۴ ارتباط فیلوژنتیکی این جدایه‌ها را با باکتری‌های دیگر نشان می‌دهد.



شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR ژن ۱۶S rRNA، ۱- سویه M2 ، ۲- سویه M26 ، ۳- مارکر DNA



شکل ۴- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن۱۶S rRNA به‌روش Neighbor joining که وابستگی سویه *Leuconostoc mesenteroides srtain* M-2 (شماره دست‌یابی:KY348703) و *Enterococcus faecium* M-26 (شماره دست‌یابی: KY348704) را با سویه‌های دیگر نشان می‌دهد.

بحث

نتایج به‌دست آمده نشان داد که تمام جدایه‌های مورد مطالعه توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید (باند شده و آزاد) را داشتندکه برای اولین بار جداسازی اگزوپلی‌ساکارید از چند محصول لبنی محلی استان کرمان گزارش شد. از میان دو سویه شناسایی شده، بیشترین میزان اگزوپلی‌ساکارید باند شده مربوط به سویه M-2 (*لکونوستوک مزنتروئیدس*) که مقدار آن ۱۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر و نیز بیشترین میزان اگزوپلی‌ساکارید رها شده آن ۱۷/۱۶ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد که نسبت به سویه M-26 که متعلق به باکتری *انتروکوکوس فاسیوم* است، در اولویت قرار دارد. به‌طور کلی میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید باند شده در بازه (۱۲/۵-۰/۰۳۳) میلی‌گرم بر لیتر و میزان رهاشده در بازه(۱۷/۱۶-۰/۰۰۱) میلی‌گرم بر لیترگزارش گردید. تولید اگزوپلی‌ساکارید سنتز شده زمانی که باکتری‌ها در شرایط رشد بهینه نیستند، بین ۰/۰۴۵ تا ۰/۳۵ میلی‌گرم بر لیتر است (Durlu et al., 2007). در مطالعه‌ای که توسط تالون و همکاران صورت گرفت، میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید حاصل از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (۱۴۰-۱۳۵) میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد. بیشتر مطالعات انجام شده در زمینه تولید اگزوپلی‌ساکارید، بر روی یک سویه مشخص انجام شده است. برای مثال از دانه کفیر فقط یک سویه تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید (کفیران) را جدا کردند (Tallon et al., 2003; Adebayo and Onilude, 2008). در بررسی دیگر فقط از یک سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* که از ذرت جدا شده بود، دو نوع اگزوپلی‌ساکارید جداسازی شد (Tallon et al., 2003). اگزوپلی‌ساکاریدها در آب حل شده و خواص ژله‌ای و قوام‌دهندگی ایجاد می‌کنند. همچنین در مواد غذایی به‌عنوان امولسیون کننده، پایدارکننده، سوسپانسیون ذرات، کنترل کریستالیزاسیون، تشکیل فیلم و انکپسوله کردن به‌کار می‌روند (De vuyst and Degeest, 1999). محصولات لبنی تولیدی به‌روش صنعتی، طعم محصولات سنتی را ندارند، یا برخی از ویژگی‌های حسی آنها بسیار ضعیف است که این امر با پاستوریزاسیون شیر و استفاده از استارترهای تجاری مشخص در ساخت محصولات لبنی صنعتی مرتبط است. در بررسی کله و همکاران تأکید شد که

باکتری‌های لاکتیک‌اسید به‌عنوان تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید، دارای پتانسیل فوق‌العاده‌ای به‌عنوان استارترهای کاربردی می‌باشند (Kele et al., 2014). برخی از مطالعات نشان داده که تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط باکتری‌های اسید لاکتیک ممکن است تحت‌تأثیر شرایط محیط کشت (منبع کربن و منبع نیتروژن) و شرایط گرم‌خانه‌گذاری قرار داشته باشد (Tallon et al ., 2003). در این مطالعه از محیط کشت ام .آر.اس براث استفاده شد تا فنوتیپ‌های تولیدکننده اگزوپلی ساکارید افزایش یابد. مطالعات انجام شده در اکثر کشورها فقط در زمینه تولید اگزوپلی‌ساکارید متمرکز بوده و نوع آن مشخص نشده است. به‌عنوان مثال در نیجریه سویه‌های باکتری‌های لاکتیک‌اسید را از برخی محصولات لبنی تخمیری و غیرلبنی تخمیری برای تولید اگزوپلی‌ساکارید غربال کردند. این محققان بجز *لاکتوباسیل‌ها* میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط *لکونوستوک‌ها* را بررسی نمودند (Adebayo and Onilude, 2008). همین‌طور از داهی (محصول تخمیری لبنی هندی) و شیر تخمیر شده در هند چندین باکتری اسید لاکتیک تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید جداسازی شد که نوع آن مشخص نبود و تماماً *لاکتوباسیل* نبودند، بلکه این محققین برخی از سویه‌های *لوکونوستوک* و *انتروکوکوس* تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید را نیز مشخص کردند (Behare et al., 2009). پاتیل و همکاران اگزوپلی‌ساکاریدها را از محصولات لبنی جداسازی نموده، دو گونه *لاکتوباسیلوس* را شناسایی کردند، ولی نوع و میزان اگزوپلی‌ساکارید بررسی نشد (Patil et al., 2015). در این پژوهش نوع اگزوپلی‌ساکارید و میزان تولید توسط هر سویه مشخص گردید.

با مقایسه منحنی رشد سویه‌ها و منحنی تولید اگزوپلی‌ساکارید می‌توان نتیجه گرفت که سویه‌های منتخب (M-2 و M-26) بیشترین تولید اگزوپلی‌ساکارید را در انتهای فاز لگاریتمی و ابتدای فاز سکون داشته و پس از آن میزان تولید کاهش یافته است. مورنو و همکارانش دریافتند که تولید اگزوپلی‌ساکارید در بیشتر باکتری‌ها بعد از توقف رشد افزایش می‌یابد (Moreno et al., 1999). از سوی دیگر مانسا و همکارانش دریافتند که بیشترین تولید اگزوپلی‌ساکارید در فاز سکون بوده، زمانی‌که پارامترهای فیزیولوژیکی مانند (اکسیژن و اسیدیته) برای تولید بیومس در بالاترین مقدار خود بوده است (Manca et al., 1996). در این تحقیق با توجه به شرایط ایجاد شده تولید اگزوپلی‌ساکارید در دو سویه مورد نظر از ابتدای فاز لگاریتمی شروع شده و در فاز سکون به بیشترین مقدار خود رسیده است که در بازه زمانی (۶۰- ۲۰ ساعت)، تولید اگزوپلی‌ساکارید روند افزایشی داشته و پس از آن کاهش تولید اگزوپلی‌ساکارید و در زمان (۵۶-۴۰) بیشترین مقدار تولید در نمونه‌ها مشاهده گردید. سویه‌های (M-2 و M-26) اثر ضدباکتریایی بر علیه باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* داشته، ولی M-26 که متعلق به *انتروکوکوس فاسیوم* می‌باشد، اثر ضدباکتریایی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا انتریکا* نیز دارد. سویه M-2 بر باکتری‌های گرم منفی اثری نداشت. بزرگ‌ترین هاله عدم رشد ابتدا نسبت به *لیستریا منوسیتوژنز* و سپس *باسیلوس سرئوس* تشکیل شد. در بسیاری از تحقیقات اگزوپلی‌ساکاریدها تأثیری بر باکتری‌های گرم منفی نداشته که علت آن وجود دیواره خارجی در باکتری‌های گرم منفی می‌باشد (Nacimento et al., 2010; Chen et al., 2007).

نتایج حاصل از این پژوهش بیان می‌دارد که بیشترین میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید میکروبی توسط باکتری‌های منتخب، ممکن است در فازهای مختلف چرخه رشد اتفاق بیفتد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که *لاکتوباسیل‌ها* در زمان ۲۴ تا ۴۸ ساعت در مرحله رشد لگاریتمی می‌باشند. میزان اگزوپلی‌ساکارید با روش فنل/سولفوریک در بازه دمایی (۴۲، ۳۷، ۳۰، ۲۵)

اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان تولید در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و کم‌ترین مقدار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و بالاتر از آن میزان تولید شدیداً کاهش یافت. پاوار و همکاران بیشترین تولید اگزوپلی‌مر را در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند (Pawar et al., 2017). در بررسی دیگر که توسط خانی و همکاران صورت گرفت، دمای بهینه تولید اگزوپلی‌ساکارید ۲۸ درجه سانتی‌گراد گزارش شد (خانی و همکاران، ۱۳۹۴). بررسی اثر دما بر تولید اگزوپلی‌ساکارید، همزمان با بررسی اسیدیته صورت گرفت که بیشترین میزان اگزوپلی‌ساکارید در اسیدیته ۷/۵ و کم‌ترین مقدار آن در اسیدیته ۶/۵ وجود داشت. بر اساس نتایج این تحقیق هر چه اسیدیته به حالت قلیایی و اسیدی نزدیک‌تر می‌شود، میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید کاهش می‌یابد. پاوار و همکاران نیز ثابت کردند که میزان اگزوپلی‌مر در باکتری‌هایی که از خاک‌های نمکی استخراج کردند، در دمای ۳۰ و اسیدیته ۷/۵ بیشترین مقدار را داشته است (Pawar et al., 2017). با توجه به نتایج این پژوهش، می‌توان بیان کرد که سویه‌هایی که میزان اسیدیته (۷/۵-۷) را دارا می‌باشند، توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید بالاتری دارند. در صورتی‌که در بررسی تاج‌آبادی ابراهیمی و همکاران در مورد تولید اگزوپلی‌ساکارید از *لاکتوباسیل‌های* جدا شده از کشک منطقه لیقوان، گزارش شده که سویه‌هایی که میزان اسیدیته پایینی دارند، از توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید بالایی برخوردار می‌باشند (تاج‌آبادی ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۲). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که باکتری‌های جدا شده از محصولات لبنی سنتی استان کرمان دارای توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید به‌صورت آزاد و باند شده می‌باشند. حداکثر مقدار تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط سویه‌های منتخب بر اساس مقایسه منحنی الگوی رشد و تولید اگزوپلی‌ساکارید، در فاز سکون می‌باشد و با تغییرات فیزیولوژیکی می‌توان مقدار اگزوپلی‌ساکارید را تحت‌تأثیر قرار داد.

تشکر و قدردانی

از گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان بویژه کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱. تاج‌آبادی ابراهیمی، مریم.، خدابخش، مریم.،شریفان، انوشه.، هاشمی، مریم.، حسینی، ابراهیم و بهرامی هدی. ۱۳۹۲. تولید اگزوپلی ساکارید از *لاکتوباسیل‌*های جدا شده از دو محصول لبنی ماست و پنیر سنتی ایران. مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی – مولکولی، ۳ (۱۲): ۴۵-۳۸.

۲. خانی، مجتبی.، بهرامی، علی و چگنی، اسما. (۱۳۹۴). اثر پارامترهای سرعت هوادهی، دما، سرعت همزدن و pH بر تولید پلی‌ساکاریدهای میکروبی. فصلنامه علمی– ترویجی بسپارش، جلد پنجم، شماره چهارم، صفحه ۲۸-۱۶.

۳. خدابخش، مریم.، تاج‌آبادی ابراهیمی، مریم و هاشمی، مریم. (۱۳۹۱). تولید اگزوپلی‌ساکارید از *لاکتوباسیل‌*های جدا شده از کشک منطقه لیقوان. فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی، جلد یک، شماره یک، صفحه ۱۰۰-۸۴ .

۴. مرسلی، پریسا. (۱۳۸۷). نقش پروبیوتیک‌ها در سلامت. مجله دانشکده پیراپزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، جلد سوم، شماره دوم، صفحه ۲۲-۲۷.

5. Adebayo-tayo, B.C., and Onilude, A.A. 2008. Screening of lactic acid bacteria strains isolated from some Nigerian fermented foods for EPS production. World Appl Sci J. 4(5): 741-7.

6. Alhudhud, M., Humphreys, P., and Laws, A. 2014. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production and structural characterisation

molecular mass of EPS produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 in milk-based medium. Food Chem. 197: 367-72.
17. Manca, M.C., Lama, L., Improta, R., Esposito, E., Gambacorta, A., and Nicolaus, B. 1996. Chemical composition of two exopolysaccharides from *Bacillus Thermoantarcticus*. Appl Environ Microbiol. 62(9): 3265–3269.
18. Moreno, J.,Vargas-Garcı´a, C., Lo´pez, M.J., and Sa´nchez-Serrano, G. 1999. Growth and exopolysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* in media containing phenolic acids. Appl Microbiol Biotechnol. 86: 439-445.
19. Nascimento, M.D., Moreno, I., and Kuaye, AY. 2010. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 against gram-positive pathogens. Braz J Microbiol. 41(1): 74-81.
20. Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegard, C., Haugen, H.S., and Kristiansen, P.E. 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-Positive Bacteria. Curr Pharm Biotechnol. 10(1): 19-37.
21. Patil, P., Wadehra, A., Munjal, K., and Behare, P. 2015. Isolation of exopolysaccharides producing lactic acid bacteria from dairy products. Asian J Chem. 34(4): 280-4.
22. Pawar, S.T., Bhosale, A.A., and Gawade, T.B. 2017. Nale TR isolation, screening and optimization of exopolysaccharide producing bacterium from saline soil. Res Rev J Microbiol Biotechnol. 3(3): 24-31.
23. Schillinger, U., and Lücke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl Environ Microbiol. 55(8): 1901-1906.
24. Settanni, L., Massitti, O., Van Sinderen, D., and Corsetti, A. 2005. In situ activity of a bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strain influence on the interactions between lactic acid bacteria during sourdough by *Bifidobacterium animalis* ssp. lactis AD011. J Microbiol Methods. 100: 93-98.
7. Arnesen, L.P.S., Fagerlund, A., and Granum, P.E. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol Rev. 32(4): 579-606.
8. Behare, P., Singh, R., and Singh, R.P. 2009. Exopolysaccharide-producing mesophilic lactic cultures for preparation of fat-free dahi–an indian fermented milk. J Dairy Res. 76(01): 90-7.
9. Chen, Y.S., Yanagida, F., and Srionnual, S. 2007. Characteristics of bacteriocin- like inhibitory substances from dochi isolated *Enterococcus faecium* D081821 and D081833. Lett Appl Microbiol. 44(3): 320-5.
10. Czaczyk, K., and Myszka, K. 2007. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. PJOES. 16(6): 799.
11. De Man, J.C., Rogosa, D., and Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli.* J Appl Microbiol. 23(1): 130-5.
12. De Vuyst, L., and Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev. 23(2): 153-77.
13. Durlu-Özkaya, F., Aslim, B., and Ozkaya, M.T. 2007. Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. *LWT* Food Sci Technol. 40(3): 564-8.
14. Frengova, G.I., Simova, E.D., Beshkova, D.M., and Simov, Z.I. 2002. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. Z Naturforsch C Bio Sci. 57(9-10): 805-810.
15. Kele, V.D., Behare, P.V., and Bajad, D.N. 2014. Impact on rheologocal properties of fermented milk products due to lactic acid bacteria. IJHSSS. 2(5): 261-264.
16. Li, D., Li, J., Zhao, F., Wang, G., Qin, Q., and Hao, Y. 2016. The influence of fermentation condition on production and

fermentation. Appl Microbiol Biotechnol. 99(3): 670-81.
25. Singha, T.K. 2012. Microbial extracellular polymeric substances: production, isolation and applications. IOSR J Pharm. 2(2): 271-81.
26. Tallon, R., Bressollier, P., and Urdaci, M.C. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. Res Microbiol Biotechnol. 154(10): 705-12.
27. Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., and Yang, Z. 2015. Isolation and characterization of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* SKT109 from Tibet kefir. PJFNS. 65(4): 269-80.

Isolation and Screening of Exopolysaccharide Producing bacteria from traditional dairy products in Kerman province and Molecular identification of them

Khodaei Jalalabadi Z[1], Soltaninejhad Sh[2]*

1- Graduated of Microbiology, Faculty of sciences, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

2- Department of Microbiology, Jiroft Branch, Islamic Azad University, Jiroft, Iran.

***Corresponding author:** *soltanibiotech@gmail.com*

Received: 14 October 2017 Accepted: 12 January 2018

Abstract

Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria play an important role in the improvement of sensory and textural properties of fermented dairy products. The aim of this study was to isolate and molecular identify of exopolysaccharide-producing bacteria from traditional dairy products in Kerman province. The traditional dairy product samples were collected aseptically and then cultured directly in MRS agar media. After purification, examining microscopic and macroscopic properties and performing biochemical tests, 20 strains were selected and production of EPS was measured with phenol/sulfuric acid method. The results were compared with the glucose standard curve and the amounts of production were determined. The EPS production pattern were compared with the growth pattern of the bacteria and the effects of the temperature and pH on the production of EPS were investigated. Finally, M-2 and M-26 were chosen as the top strains and identified by molecular method. Then the produced EPS was extracted and antimicrobial activity was investigated with Agar diffusion method. the results showed that the 20 isolates produced two kinds of EPS. Two isolates including M-2 and M-26 had the maximum amount of production belonged to *Leuconostoc mesenteroides* and *Enterococcus faecium* respectively. The production of the EPS in the PH 6.5-8 under the temperature 25-42˚C were investigated and the results showed that the maximum amount of production was at the 37˚C and pH=7.5 in the end of logarithmic growth. The results of this study indicate EPS production is possible by traditional dairy products of Kerman province.

Keywords: Dairy products, exopolysaccharides, *Enterococcus faecium*, Leuconostoc mesenteroides