جداسازی بیفیدوباکتریوم‌ها و شناسایی مولکولی آن‌ها در انواع ماست و پنیر صنعتی و سنتی

سارا ثابتی[a*]، محمد خضری[b]، داوود سالارباشی[c*]، الیاس نطاق اشتیوانی[d]

[a] *دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی، گروه علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، ایران*
[b] *استادیار میکروبیولوژی مواد غذایی، آزمایشگاه کنترل مواد غذایی، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد ایران*
[c] *دانشیار علوم و صنایع غذایی، گروه بیوشیمی و تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، ایران*
[d] *استادیار علوم تغذیه، گروه بیوشیمی و تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۴/۰۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۶/۳۱

چکیده

مقدمه: پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده غیر بیماری زا هستند که برای بهبود تعادل میکروبی به ویژه در دستگاه گوارش تجویز می‌شوند. بیفیدوباکتریوم، یکی از مهم ترین گروه‌های پروبیوتیک است که به دلیل فواید افزایش دهنده سلامتی، به طور گسترده در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ماست و پنیر از اجزای مهم رژیم غذایی هستند. با وجود این، بررسی متون نشان داد که مطالعات کافی در خصوص جداسازی پروبیوتیک‌ها به ویژه بیفیدوباکتریوم از ماست و پنیر پروبیوتیک صنعتی و سنتی تولید شده در شهرهای خاص خراسان رضوی وجود ندارد. لذا مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی بیفیدوباکتریوم در این محصولات با استفاده از روش‌های کشت و PCR انجام شد.

مواد و روش‌ها: در مجموع ۲۰ نمونه ماست و ۱۰ نمونه پنیر جمع‌آوری شد. محصولات سنتی از شهرهای مشهد، نیشابور و گناباد در استان خراسان رضوی جمع آوری شدند. هر نمونه تحت رقت، همگن سازی و کشت در محیط‌کشت اختصاصی TOS قرار گرفت. شناسایی بیفیدوباکتری‌ها با استفاده از تکنیک شمارش کلونی بر اساس روش استاندارد بین‌المللی ISO ۲۰۲۴ : (IDF ۲۲۰) ۲۹۹۸۱ که بر اساس مورفولوژی سلولی و رنگ‌آمیزی گرم کلنی‌های شاخص بود، انجام شد. سپس از روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تایید نهایی این جدایه‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: پس از کشت بی‌هوازی نمونه‌ها بر روی محیط کشت اختصاصی TOS، بیفیدوباکتری‌هایی با مورفولوژی نامنظم، میله‌ای یا شاخه‌دار در اکثر نمونه‌های سنتی و صنعتی مشاهده شد. فراوانی بیفیدوباکتریوم در محیط TOS برای ماست و پنیر صنعتی پروبیوتیک به ترتیب ٪۴۴/۴ و ٪۱۰۰ و در ماست و پنیر سنتی، ٪۹۰/۹ و ٪۸۵/۷ بود.

نتیجه‌گیری: جداسازی بیفیدوباکتریوم از ماست و پنیر سنتی نشان داد که این محصولات سنتی منبع امیدوارکننده‌ای از سویه‌های پروبیوتیک هستند. در آینده، بررسی سویه‌های بومی ممکن است منجر به معرفی استارترهای منطقه‌ای شود که با میکرو فلور گوارشی جمعیت محلی سازگارتر است. با این حال، تعیین گونه نیاز به توالی و بررسی بیشتر دارد.

واژه‌های کلیدی: بیفیدوباکتریوم، پنیر، ماست، *PCR*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: sabetis1994@gmail.com, Davoud.salarbashi3@gmail.com

مقدمه

پروبیوتیک‌ها توسط سازمان بهداشت جهانی و سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد[1] به‌عنوان «میکروارگانیسم‌های زنده‌ای که مصرف آن‌ها، به‌مقدار کافی برای سلامتی میزبان مفید است» تعریف شدند. واژه پروبیوتیک از زبان یونانی گرفته شده و به معنای "برای زندگی" است (Hotel and Cordoba, 2001). غذای پروبیوتیک به عنوان یک محصول فرآوری شده تعریف می‌شود که حاوی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک زنده در زمینه مناسب و در غلظت کافی باشد (Saxelin *et al*., 2003). ماست و پنیر به عنوان مهمترین محصولات تخمیری به دلیل میزان کلسیم و فسفر بالا، از محبوب ترین فرآورده‌های لبنی تخمیری می‌باشند. ماست از هم زیستی دو باکتری همو فرمنتاتیو[2] *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*[3] و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*[4] تولید و اهمیت ویژه‌ای در رژیم غذایی افـراد دارند (Tesfaye *et al*., 2019).

بیفیدوباکتری‌ها به طور کلی به عنوان بی‌هوازی‌های گرم مثبت، غیر اسپورساز، غیر متحرک و کاتالاز منفی شناخته می‌شوند که گلوکز را به طور انحصاری و از مسیر فروکتوز ۶ فسفات می‌شکنند. همچنین جزو گونه‌های کمی هستند که قادر به سازگاری در اتمسفر حاوی ۱۰٪ CO_2 می‌باشند (Perry and Staley, 1997). جنس Bifidobacterium متعلق به شاخه Actinobacteria است که در آن، گونه‌ها دارای مورفولوژی نامنظم هستند و به صورت منحنی (club-shaped)، میله‌ای کوتاه و میله‌ای Y شکل دو شاخه یا منشعب ظاهر می‌شوند (Madigan et al., 2004). دمای رشد بهینه این میکروارگانیسم، ۳۷°C تا ۴۱°C می‌باشد. در حال حاضر ۳۰ گونه در جنس بیفیدوباکتریوم وجود دارند که ۱۰ گونه از منابع انسانی (پوسیدگی دندان، مدفوع و واژن)، ۱۷ گونه از روده یا شکمبه حیوانات، دو گونه از فاضلاب و یکی از شیر تخمیر شده، جدا شده است (Kim *et al*., 2020). چندین گونه از این جنس، یکی از گروه‌های اصلی باکتری‌های پروبیوتیک را تشکیل می‌دهند (Fontana *et al*., 2013).

روش‌های سنتی مبتنی بر کشت با عوامل انتخابی همچنان محبوب‌ترین روش‌ها برای جداسازی پروبیوتیک هستند (Ho *et al*., 2022). پژوهشگران در طول تاریخ بر رویکردهای فنوتیپی کلاسیک (آزمایش‌های کشت و بیوشیمیایی) برای تشخیص و شناسایی بیفیدوباکتری‌ها تکیه کرده‌اند. این رویکردها هنوز دارای ارزش‌هایی برای شناسایی و تشخیص برخی گونه‌های بیفیدوباکتری هستند، اما آنها اغلب، فشرده و زمان بر هستند و می‌توانند در تمایز گونه‌های نزدیک به هم مشکل ساز باشند. روش‌های سریع، دقیق و قابل اعتماد برای تشخیص و شناسایی بیفیدوباکتری‌ها در یک جمعیت باکتریایی مخلوط به یک چالش بزرگ تبدیل شده‌است (Mianzhi and Shah, 2017). شناسایی خصوصیات بیفیدوباکتریوم از طریق روش‌های مولکولی، عمدتاً از رویکردهای ژنوتیپی مبتنی بر اسید نوکلئیک بهره برده است (Satokari *et al*., 2003).

ماست و پنیر از این نظر منحصر به فرد هستند که می‌توانند حاوی هر دو کشت استارتر و پروبیوتیک باشند. تفاوت عمده بین ماست و پنیر استاندارد و پروبیوتیک اضافه کردن باکتری‌های پروبیوتیک مانند *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* است (Ebojie, 2016). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های غیر پاتوژن و مفیدی هستند که شناسایی آنها در محصولات لبنی سنتی نه تنها می‌تواند منجر به جداسازی باکتری‌های پروبیوتیکی با خصوصیات ویژه شود، بلکه می‌تواند دیدگاه مناسبی برای تولید انبوه محصولات لبنی سنتی که به طور طبیعی حاوی باکتری‌های پروبیوتیکی هستند به ما عرضه کند (Koushki *et al*., 2014). بنابراین، جداسازی و شناسایی انواع باکتری‌های بالقوه پروبیوتیک از محصولات لبنی مختلف سنتی می‌تواند به حفظ این باکتری‌ها برای استفاده در محصولات غذایی تخمیری و کاربردی کمک کند (Abiri *et al*., 2021).

در مطالعات گذشته، در محصولات لبنی، باکتری‌های لاکتیک اسید به ویژه لاکتوباسیلوس با پتانسیل پروبیوتیکی شناسایی شدند و تاکنون جداسازی و شناسایی مولکولی بیفیدوباکتریوم‌ها از انواع ماست و پنیر سنتی در سه شهر مشهد، گناباد و نیشابور انجام نشده است. همچنین در مطالعات گذشته مقایسه مولکولی بیفیدوباکتریوم‌ها بین

[1] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)
[2] Homofermentative
[3] *Streptococcus thermophilus*
[4] *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

انواع ماست و پنیر سنتی و صنعتی صورت نگرفته است. درحال حاضر فقط محصولات پروبیوتیک در سطح محدود در برخی واحدهای لبنی و در فرآورده‌های محدودی مانند انواع ماست و پنیر تولید و مصرف می‌شود. این مطالعه، با ایجاد این دیدگاه علمی از وضعیت وجود باکتری‌های پروبیوتیک در فرآورده‌های سنتی طبیعی، منجر به ترویج فرهنگ استفاده از فرآورده‌های سنتی می‌شود. بنابراین، هدف از انجام این مطالعه، جداسازی و شناسایی مولکولی بیفیدوباکتریوم‌ها از انواع ماست و پنیر صنعتی و سنتی است و بر این اساس الگوی مناسب برای تولید انبوه آن‌ها در سطح صنعتی ایجاد خواهد شد که منجر به افزایش تولید و مصرف این فرآورده‌ها در دراز مدت خواهد شد؛ که این باعث خودکفایی در واردات استارتر می‌شود و منجر به کاهش هزینه در تولید محصولات پروبیوتیک خواهد شد.

مواد و روش‌ها

- شناسایی میکروبی بیفیدوباکتریوم

شناسایی، شمارش و جداسازی بیفیدوباکتریوم‌ها بر اساس روش استاندارد بین‌المللی ISO ۲۹۹۸۱:۲۰۲۴ (IDF ۲۲۰) روش bifidobacteria colony count technique براساس مورفولوژی سلولی، رنگ آمیزی گرم کلنی‌های شاخص انجام شد (ISO, 2024).

TOS-agar[1] باعث رشد بیفیدوباکتریوم‌های مورد استفاده در فرآورده‌های لبنی می‌شود، که توسط سایر باکتری‌های اسید لاکتیک قابل استفاده نیستند. در این مطالعه از محیط کشت اختصاصی TOS-MUP استفاده شد. موپیروسین برای مهار رشد باکتری‌های غیر هدف اضافه می‌شود و گزینش‌پذیری محیط را افزایش می‌دهد (Roy, 2001).

نمونه‌های صنعتی از سوپرمارکت‌های مشهد خریداری شدند، در حالی که نمونه‌های سنتی به طور تصادفی از مغازه‌های لبنیات محلی در همان سه شهر تهیه شدند. تمام جمع‌آوری‌ها، تحت نظارت بهداشت، در پاییز ۱۴۰۳ انجام شد. سپس نمونه‌ها برای تجزیه و تحلیل بیشتر به آزمایشگاه میکروبی غذا و داروی مشهد منتقل شدند.

در مجموع ۲۰ نمونه ماست و ۱۰ نمونه پنیر جمع‌آوری شد. ۹ نمونه ماست پروبیوتیک از ۵ نوع برند A، B، C، D و E؛ ۳ نوع پنیر پروبیوتیک از ۳ برند F، G و H؛ ۱۱ ماست سنتی و ۷ پنیر سنتی از ۳ شهر مشهد(M)، گناباد(G) و نیشابور(N) استان خراسان رضوی جمع‌آوری شد. از هر نمونه، ۱۰ گرم با دقت ۰/۰۵ گرم وزن شد و با استفاده از رقیق‌کننده پپتون نمکی (MRD[2]) به صورت سریالی رقیق شد تا به رقت ۰/۰۰۱ برسد. ۱ میلی‌لیتر از رقت ۰/۰۰۱ به یک پلیت خالی منتقل و با ۱۲ تا ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مربوطه مخلوط شد. برای دقت بیشتر، هر آزمایش، برای هر نمونه با ۳ بار تکرار با رقت ۰/۰۰۱ انجام شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط بی‌هوازی انکوبه شدند و از جارهای بی‌هوازی برای حفظ محیط مناسب استفاده شد. پس از انکوباسیون، کلنی‌های بیفیدوباکتریوم بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی آنها، از جمله مورفولوژی کلنی و سلولی در محیط‌های انتخابی، مشاهده و جداسازی شدند. فقط پلیت‌هایی که حاوی ۳۰۰ واحد تشکیل کلنی (CFU) یا کمتر بودند و کلنی‌های سفید رنگ داشتند، برای بررسی میکروسکوپی و مورفولوژیکی انتخاب شدند (ISO, 2024).

- تایید بیفیدوباکتریوم‌ها به روش PCR

برای شناسایی باکتری‌ها به روش PCR، ابتدا استخراج DNA به روش عمومی استخراج باکتری‌های گرم مثبت صورت گرفت. برای استخراج DNA از کیت blackPREP Food DNA I Kit استفاده شد. پس از استخراج DNA، با استفاده از مستر میکس قرمز امپلیکون، برنامه دمایی و زمانی PCR انجام شد و ژن ۱۶S rRNA تکثیر شد. در نهایت محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ w/v، با رنگ‌آمیزی با Safe Stain و نمودار شدن در زیر نور آبی مرئی، مشاهده شدند (Mashak, 2016). از ۱۶S rRNA، یک قطعه ژن یک کیلوبایتی با استفاده از آغازگرهای (5'-7-f AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و 261-r (5'AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') تکثیر شد.

[1] Trans-galactosylated Oligosaccharide Agar

[2] Maximum Recovery Diluent

- تجزیه و تحلیل آماری

آنالیزهای آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ انجام شد. مقایسه میانگین داده‌های حاصل توسط آزمون آماری chi-square و تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از Crosstabs انجام شد. در نهایت مقادیر $p < ۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها

- بررسی ماکروسکوپی بیفیدوباکتریوم

کلنی‌های مربوط به گونه بیفیدوباکتریوم بر روی محیط کشت TOS-MUP، متمایل به سفید مدور یا دوکی شکل[1]، تا حدودی ستاره‌ای شکل و یا برگ شبدری به قطر ۱ mm تا ۴ mm، مشاهده شدند.

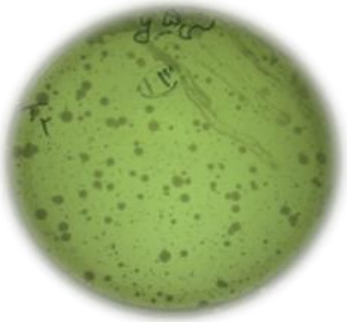

Figure 1- Colonies of *Bifidobacteria* after incubation at 37 °C under anaerobic conditions for 48–72 h on TOS culture medium

شکل ۱- کلنی‌های *بیفیدوباکتریوم* پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط بی‌هوازی به مدت ٤٨ تا ٧٢ ساعت در محیط کشت TOS

- بررسی حضور بیفیدوباکتریوم در انواع ماست و پنیر

در این مطالعه ۹ ماست پروبیوتیک از ۵ نوع برند A، B، C، D، E (که از برند A و E، ۲ تاریخ تولید متفاوت و از برند D، ۳ تاریخ تولید متفاوت تهیه شد.) و ۱۱ ماست سنتی از ۳ شهر استان خراسان رضوی جمع‌آوری شد؛ که ۴ نمونه از شهر مشهد (M)، ۴ نمونه از شهر گناباد (G) و ۳ نمونه از شهر نیشابور (N) از نظر وجود باکتری بیفیدوباکتریوم در محیط کشت TOS با ۳ بار تکرار با رقت ۰/۰۰۱ مورد بررسی قرار گرفت؛ که وجود و عدم حضور کلنی‌های مشاهده شده به صورت کمی به شرح جدول ۱ می‌باشد. با توجه به جدول ۱، بیفیدوباکتریوم در ماست‌های صنعتی پروبیوتیک A_2، B، C و E_2 و در همه‌ی ماست‌های سنتی به جز یکی از ماست‌های سنتی مشهد (M_1)، مشاهده شد.

همچنین در این مطالعه ۳ پنیر پروبیوتیک از ۳ برند F، G، H و ۷ پنیر سنتی از ۳ شهر استان خراسان رضوی جمع‌آوری شد؛ که ۳ نمونه از شهر مشهد (M)، ۲ نمونه از شهر گناباد (G) و ۲ نمونه از شهر نیشابور (N) از نظر وجود باکتری بیفیدوباکتریوم در محیط کشت TOS با ۳ بار تکرار با رقت ۰/۰۰۱ مورد بررسی قرار گرفت؛ که وجود و عدم حضور کلنی‌های مشاهده شده به صورت کمی به شرح جدول ۲ می‌باشد. همانطور که در جدول ۲ ذکر شده است، در تمام نمونه‌های پنیر صنعتی پروبیوتیک و همه‌ی نمونه‌های پنیر سنتی، به جز در یکی از پنیرهای سنتی گناباد (G_2)، بیفیدوباکتریوم مشاهده شد.

با توجه به جدول ۳، از نظر وجود بیفیدوباکتریوم تفاوت معناداری بین انواع ماست سنتی و صنعتی پروبیوتیک وجود دارد و به صورت کلی، در ٪۷۰ انواع ماست، بیفیدوباکتریوم مشاهده شد؛ که به تفکیک صنعتی و سنتی به ترتیب ٪۴۴/۴ و ٪۹۰/۹ می‌باشد.

همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، از نظر وجود بیفیدوباکتریوم تفاوت معناداری بین انواع پنیر سنتی و صنعتی پروبیوتیک وجود ندارد و به صورت کلی، در ٪۹۰ انواع پنیر، بیفیدوباکتریوم مشاهده شد؛ که به تفکیک صنعتی و سنتی به ترتیب ٪۱۰۰ و ٪ ۸۵/۷ می‌باشد.

مقایسه‌ی مشاهده و عدم مشاهده بیفیدوباکتریوم در محیط کشت TOS در انواع ماست و پنیر در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

- بررسی میکروسکوپی بیفیدوباکتریوم

تصاویر رنگ‌آمیزی باکتری‌ها در شکل ۲ آمده است. بیفیدوباکتریوم‌ها گرم مثبت با مورفولوژی میله‌ای کوتاه و منحنی (club-shaped) و میله‌ای Y شکل دوشاخه مشاهده شدند.

با توجه به جدول ۵، تقریبا ادعای بیشتر محصولات با نتایج مشاهده شده تطابق دارد؛ به جز ماست A_2، انواع ماست برند D و ماست E_1 که نتایج مشاهده شده برخلاف ادعای محصول می‌باشد. همانطور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، از بین ۵ برند ماست صنعتی پروبیوتیک، ادعای ۲

[1] Lenticular

برند و از بین ۳ برند پنیر پروبیوتیک، ادعای تمام آن‌ها کاملا با نتایج آزمایشات میکروبی تطابق داشت. بنابراین، برای تایید صحت نتایج آزمون میکروبی از روش PCR به عنوان تست نهایی استفاده کردیم.

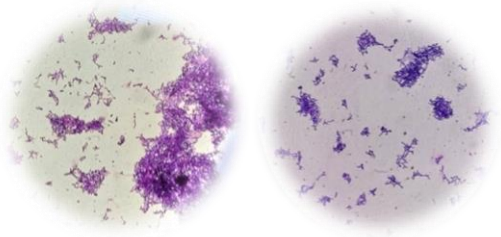

Figure 2- Microscopic morphology of *Bifidobacteria* isolated from yoghurt and cheese samples.

شکل ۲- ریخت‌شناسی میکروسکوپی *بیفیدوباکتریوم*های جدا شده از نمونه‌های ماست و پنیر.

جدول ۱- تعداد کلنی‌های مشاهده شده در محیط کشت TOS در ماست‌های صنعتی پروبیوتیک و سنتی ۳ شهر خراسان رضوی

Table 1- Number of colonies observed in TOS culture medium in industrial probiotic and traditional yogurts in 3 cities of Khorasan Razavi

Sample	TOS (cfu/g)
Yogurt A_1	<1000
Yogurt A_2	1.8×10^7
Yogurt B	4.32×10^6
Yogurt C	2.88×10^6
Yogurt D_1	<1000
Yogurt D_2	<1000
Yogurt D_3	<1000
Yogurt E_1	<1000
Yogurt E_2	5×10^5
Traditional yogurt M_1	<1000
Traditional yogurt M_2	6×10^5
Traditional yogurt M_3	10^5
Traditional yogurt M_4	1.8×10^7
Traditional yogurt G_1	1.4×10^5
Traditional yogurt G_2	8×10^4
Traditional yogurt G_3	5.4×10^6
Traditional yogurt G_4	7×10^5
Traditional yogurt N_1	2.16×10^6
Traditional yogurt N_2	2.16×10^7
Traditional yogurt N_3	2.88×10^7

جدول ۲- تعداد کلنی‌های مشاهده شده در محیط کشت TOS در پنیرهای صنعتی پروبیوتیک و سنتی ۳ شهر خراسان رضوی

Table 2- Number of colonies observed in TOS culture medium in probiotic industrial and traditional cheeses in 3 cities of Khorasan Razavi

Sample	TOS (cfu/g)
Cheese F	5×10^5
Cheese G	3.6×10^6
Cheese H	2.04×10^6
Traditional cheese M_1	5×10^5
Traditional cheese M_2	10^5
Traditional cheese M_3	1.8×10^7
Traditional cheese G_1	1.8×10^7
Traditional cheese G_2	<1000
Traditional cheese N_1	3.6×10^6
Traditional cheese N_2	3.6×10^6

جدول ۳- فراوانی و درصد حضور و عدم حضور *بیفیدوباکتریوم* در محیط کشت TOS در نمونه‌های ماست صنعتی و سنتی و در مجموع

Table 3- Frequency and percentage of the presence and absence of *Bifidobacteria* on TOS culture medium in industrial and traditional yogurt samples, and in total.

Yogurt type	*Bifidobacteria* absent (N, %)	*Bifidobacteria* present (N, %)	Total (N, %)	Fisher's exact test result
Industrial	5 (55.6%)	4 (44.4%)	9 (100%)	
Traditional	1 (9.1%)	10 (90.9%)	11 (100%)	*P-Value= 0/49*
Total	6 (30%)	14 (70%)	20 (100%)	

جدول ٤- فراوانی و درصد حضور و عدم حضور *بیفیدوباکتریوم* در محیط کشت TOS در نمونه‌های پنیر صنعتی و سنتی و در مجموع

Table 4- Frequency and percentage of the presence and absence of *Bifidobacteria* on TOS culture medium in industrial and traditional cheese samples, and in total

Cheese type	*Bifidobacteria* absent (N, %)	*Bifidobacteria* present (N, %)	Total (N, %)	Fisher's exact test result
Industrial	0 (0%)	3 (100%)	3 (100%)	
Traditional	1 (14.3%)	6 (85.7%)	7 (100%)	*P-Value = 1*
Total	1 (10%)	9 (90%)	10 (100%)	

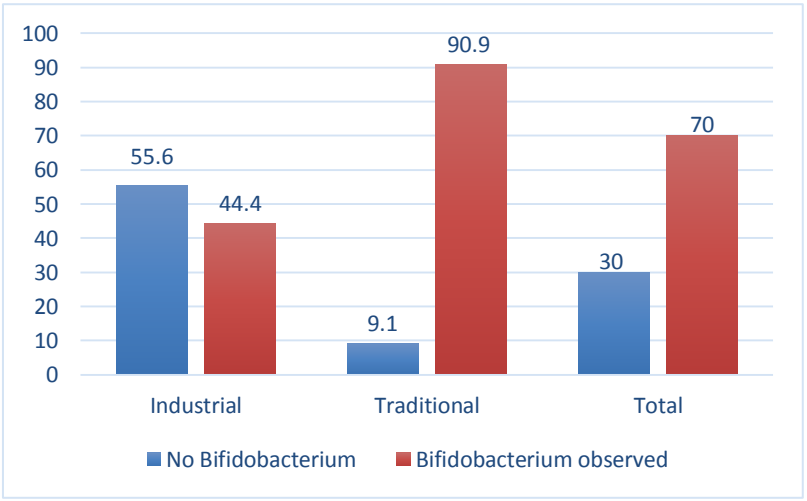

Figure 3- Presence and absence of *Bifidobacteria* in TOS culture medium among industrial and traditional yogurt samples

شکل ۳- حضور و عدم حضور *بیفیدوباکتریوم* در محیط کشت TOS در نمونه‌های ماست صنعتی و سنتی

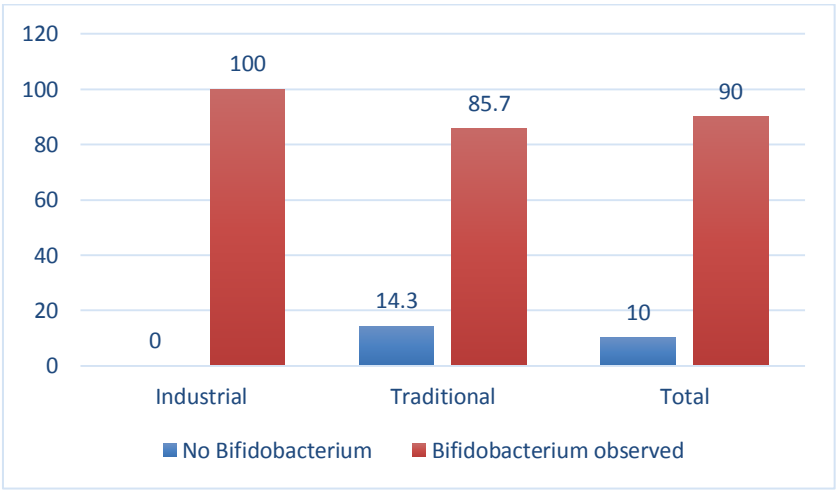

Figure 4- Presence and absence of *Bifidobacteria* in TOS culture medium among industrial and traditional cheese samples

شکل ٤- حضور و عدم حضور *بیفیدوباکتریوم* در محیط کشت TOS در نمونه‌های پنیر صنعتی و سنتی

- نتایج شناسایی بیفیدوباکتریوم‌ها به روش PCR

برای تایید نهایی، ۹ نمونه مشکوک از بین تمام نمونه‌ها انتخاب و PCR انجام شد. با توجه به شکل ۵، نتایج PCR به شرح جدول ۶ می‌باشد.

با توجه به جدول ۶، به جز نمونه‌های ماست A_2، D_1 و E_1، نتایج میکروبی و PCR سایر نمونه‌ها کاملا با هم مطابقت دارند. بنابراین با توجه به جدول ۶، با در نظر گرفتن نتیجه PCR، به عنوان تست تاییدی، ادعای ۳ برند ماست A_2، D_1 و E_1 برخلاف آنچه (مشاهده میکروسکوپی) که در جدول ۵ ذکر شد، صحیح می‌باشد.

جدول ۵- مقایسه ادعای محصولات صنعتی پروبیوتیک با نتایج مشاهده شده

Table 5- Comparison of claims of industrial probiotic products with observed results

Product type	Product Claim	Observed result	Compliance or non-compliance with product claims
Yogurt A_1	*Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus/Starter: Lactobacillus L. Casei*	*Bifidobacteria* were not observed.	It complies with the product claim.
Yogurt A_2		*Bifidobacteria* were observed.	It does not comply with the product claim.
Yogurt B	*Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus, Streptococcus thermophilus/Starter: Bifidobacterium animalis subspecies lactis or Lactobacillus acidophilus or Lactobacillus casei*	*Bifidobacteria* were observed.	It complies with the product claim.
Yogurt C	*Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus/Starter: Lactobacillus acidophilus or Bifidobacterium bifidium*	*Bifidobacteria* were observed.	It complies with the product claim.
Yogurt D_1 & D_2	*Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus/Starter: Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium*	*Bifidobacteria* were not observed.	It does not comply with the product claim.
Yogurt D_3	*Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium*	*Bifidobacteria* were not observed.	It does not comply with the product claim.
Yogurt E_1	*Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus/Starter: Bifidobacterium lactis*	*Bifidobacteria* were not observed.	It does not comply with the product claim.
Yogurt E_2	*Bifidobacterium lactis*	*Bifidobacteria* were observed.	It complies with the product claim.
Cheese F	*Bifidobacterium lactis or Lactobacillus acidophilus*	*Bifidobacteria* were observed.	It complies with the product claim.
Cheese G	*Bifidobacterium or Lactobacillus acidophilus*	*Bifidobacteria* were observed.	It complies with the product claim.
Cheese H	*Bifidobacterium*	*Bifidobacteria* were observed.	It complies with the product claim.

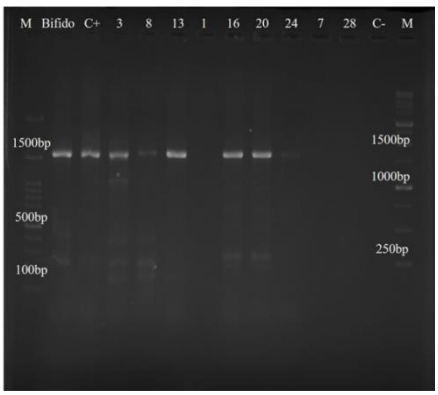

Figure 5- PCR amplification of *Bifidobacteria* isolates.

M: DNA ladder; *Bifido*: reference *Bifidobacteria* strain; C^+ : positive control; C^- : negative control; lanes 3, 8, 13, 16, 20, and 24: positive samples (~1500 bp); lanes 1, 7, and 28: negative samples.

شکل ۵ -تکثیر PCR از جدایه‌های *بیفیدوباکتری‌ها*.

M: نردبان DNA؛ *بیفیدوباکتری‌ها*: سویه مرجع ب*یفیدوباکتری‌ها*؛ C^+: کنترل مثبت؛ C^-: کنترل منفی؛ ردیف‌های ۳، ۸، ۱۳، ۱۶، ۲۰ و ۲۴: نمونه‌های مثبت (حدود ۱۵۰۰ جفت باز)؛ ردیف‌های ۱، ۷ و ۲۸: نمونه‌های منفی.

جدول ۶- مقایسه نتایج PCR با تایید مورفولوژیکی روی محیط کشت TOS در ۹ نمونه ماست و پنیر منتخب

Table 6- Comparison of PCR results with morphological confirmation on TOS in nine selected yogurt and cheese samples

Sample No.	Sample type	Morphological confirmation in the TOS agar medium culture	Final confirmation test result by PCR method
1	Traditional yogurt M_1	-	-
3	Traditional yogurt G_1	+	+
7	Yogurt A_2	+	-
8	Yogurt D_1	-	+
13	Traditional yogurt N_3	+	+
16	Yogurt E_1	-	+
20	Traditional cheese M_1	+	+
24	Cheese G	+	+
28	Traditional cheese G_2	-	-

بحث

در مطالعه حاضر، کلنی‌های مربوط به گونه بیفیدوباکتریوم بر روی محیط کشت TOS-MUP، متمایل به سفید مدور یا دوکی شکل، تا حدودی ستاره‌ای شکل و یا برگ شبدری به قطر mm ۱ تا mm ۴، مشاهده شدند. به صورت میانگین تعداد کلنی‌های مشاهده شده در ماست و پنیر صنعتی پروبیوتیک به ترتیب $۲/۸۶\times۱۰^{۶}$ CFU/g و $۲/۰۵\times۱۰^{۶}$ و در ماست و پنیر سنتی به ترتیب $۷/۰۵\times۱۰^{۶}$CFU/g و $۶/۲۶\times۱۰^{۶}$ بود.

مطالعه‌ای که توسط Mashak (۲۰۱۶) انجام شد، نمونه‌های کشک زرد از نظر وجود سویه‌های بیفیدوباکتریوم مورد بررسی قرار گرفت. مطابق با این مطالعه، تعداد کلنی برای ایزوله‌های فرض شده بیفیدوباکتریوم از ۲,۳۷ log CFU/mL تا ۷,۱۷ متغیر بود. حد پایین توصیه شده توسط فدراسیون بین المللی لبنیات (IDF) برای تعداد بیفیدوباکتری‌ها در محصولات لبنی $۱۰^{۶}$ CFU/mL است. پنجاه و چهار جدایه که به صورت کلنی‌های سفید و گرد یا دوکی روی mMRS آگار ظاهر شدند، بیفیدوباکتریوم در نظر گرفته شدند. از بین این جدایه‌ها، تنها ۱۲ جدایه به عنوان G+ و میله‌ای شکل شناسایی شدند (Mashak, 2016). محصول لبنی در این مطالعه با مطالعه حاضر متفاوت می‌باشد؛ با این حال، یافته‌های هر دو مطالعه، مشاهدات مشابهی را در مورد شناسایی بیفیدوباکتریوم نشان می‌دهد.

در مطالعه Elobaid و همکاران (۲۰۲۰) که شامل جداسازی و شناسایی بیفیدوباکتریوم از چهار فرآورده لبنی مختلف بود، ۲۰ نمونه جمع آوری شد. در مطالعه فعلی، ۳۰ نمونه از ۲ نوع فرآورده‌ی لبنی جمع آوری شد. محصولات لبنی مورد استفاده در مطالعه Elobaid و همکاران (۲۰۲۰) همانند مطالعه حاضر، با دقت انتخاب شدند تا معیارهای زیر را برآورده کنند: الف) محصولات باید در بین جمعیت محبوب باشند و به طور منظم مصرف شوند و ب) برای محصولات تجاری مورد استفاده، در دسترس بودن بیفیدوباکتریوم در محصولات نیاز به تایید سازنده محصولات تجاری داشت. محصولات مورد استفاده در این مطالعه ماست و پنیر در ۲ نوع صنعتی پروبیوتیک و سنتی بود که با محصولات Elobaid و همکاران (۲۰۲۰) که شامل پودر ماست، نوشیدنی ماست پاستوریزه، کفیر شیر گاو و ماست خانگی بود، تا حدودی متفاوت بود. در مطالعه Elobaid و همکاران (۲۰۲۰) ، هر نمونه با استفاده از یک لوپ به یک صفحه MRS آگار به عنوان محیط انتخابی تلقیح شد. سپس به صورت بی هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. جدایه‌ها با رنگ آمیزی گرم و حساسیت آن‌ها به موپیروسین تأیید شدند. اما در مطالعه حاضر از محیط کشت TOS- MUP استفاده شد. مورفولوژی حاصل از مشاهدات رنگ آمیزی گرم جدایه‌های بیفیدوباکتریوم، ویژگی‌های ساختاری کلیدی بیفیدوباکتریوم را نشان داد که شامل ساختار میله‌ای Y شکل دوشاخه‌ای است که همراستا با مشاهدات مطالعه حاضر است. بیفیدوباکتریوم با ساختار میله‌ای شکل به طور مشخص در مشاهده رنگ آمیزی گرم برای نمونه‌های گرفته شده از نوشیدنی ماست پاستوریزه دیده شد. از ۲۰ نمونه آزمایش شده، شش ایزوله شناسایی شده به عنوان بیفیدوباکتریوم بر روی آگار Man Rogosa Sharpe (MRS) از ۴ منبع مختلف جدا شد و با آزمایش‌های رنگ‌آمیزی گرم و تست حساسیت آن به موپیروسین شناسایی شد. پنج جدایه از ماست خانگی و یک جدایه از نوشیدنی ماست پاستوریزه به دست آمد (Elobaid *et al.*,

2020). بر اساس مطالعه فعلی، بیفیدوباکتریوم در ۴ نمونه از ۹ نمونه ماست صنعتی پروبیوتیک و ۱۰ نمونه از ۱۱ نمونه ماست سنتی و در گروه پنیرها، همه‌ی پنیرهای صنعتی پروبیوتیک و در ۶ نمونه از ۷ نمونه پنیر سنتی مشاهده شد.

مطالعات Taye و همکاران (۲۰۲۱)، بر روی گاوهای شیرده برای جداسازی و شناسایی LAB از محصولات لبنی موجود در شهر باهیر دار، شمال غربی اتیوپی و اطراف آن انجام شد. در مجموع ۴۱ جدایه باکتریایی بر اساس مورفولوژی رشد در محیط‌های انتخابی و سایر آزمایش‌های بیوشیمیایی تحت پنج جنس مختلف LAB مانند لاکتوباسیلوس (۲۴,۳۸٪)، لاکتوکوکس (۲۱/۹۴٪)، لوکونوستوک (۱۴/۶۴٪)، پدیوکوک (۷/۳۱٪)، استرپتوکوک (۱۹/۵۱٪) و بیفیدوباکتریوم (۱۲/۱۹٪) از شیر خام، پنیر و ماست جدا و شناسایی شدند. گونه‌های لاکتوباسیلوس شایع ترین LAB جدا شده از شیر و ماست در میان جنس‌های شناسایی شده بودند. با این حال، گونه‌های لاکتوکوکس و بیفیدوباکتریوم به نسبت بیشتری در پنیر یافت شد (Taye *et al.*, 2021). با توجه به جداول ۳ و ۴، مطالعه حاضر نشان داد که به صورت کلی بین ۲ محصول لبنی ماست و پنیر صرف نظر از نوع صنعتی پروبیوتیک و سنتی، در نمونه‌های پنیر (۹۰٪)، بیفیدوباکتریوم بیشتری نسبت به نمونه‌های ماست (۷۰٪) وجود دارد؛ که این نتیجه مشابه نتیجه Taye و همکاران (۲۰۲۱) بود.

TOS-agar باعث رشد بیفیدوباکتریوم‌های مورد استفاده در فرآورده‌های لبنی می‌شود و آنتی بیوتیک موپیروسین لیتیوم سالت (MUP)[1]، رشد اغلب باکتری‌های اسید لاکتیک را که به طور معمول در فرآورده‌های لبنی تخمیری و فرآورده‌های لبنی غیر تخمیری استفاده می‌شوند، را مهار می‌کند. به دلیل انتخابی بودن آنتی بیوتیک MUP، هیچکدام از باکتری‌های شاخص ماست (*استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکئی* زیرگونه *بولگاریکوس*) و نیز *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، و *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* روی محیط کشت TOS-agar، رشد نمی‌کنند. بنابراین، در این مطالعه از محیط کشت اختصاصی TOS-MUP استفاده شد. در همین راستا، در مطالعه Mashak (۲۰۱۶)، آزمایش‌های حساسیت موپیروسین برای تمایز بیفیدوباکتری‌ها از لاکتوباسیل‌ها انجام شد، زیرا ویژگی‌های کشت و بیوشیمیایی هر دو جنس همپوشانی دارند. بیفیدوباکتری‌ها به موپیروسین مقاوم هستند، در حالی که لاکتوباسیل‌ها به آن حساس هستند (Mashak, 2016).

همانطور که گفته شد در این مطالعه از PCR به عنوان تست تایید نهایی استفاده شد. برای این منظور ژن ۱۶SrRNA و آغازگرهای (پرایمرهای) (5'–7-f AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و (5'AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 261-r تکثیر شدند. نتیجه این تکثیر یک قطعه حدودا ۱۵۰۰ bp بود. به این ترتیب از ۹ نمونه مورد آزمایش، ۶ نمونه پس از تکثیر با آغازگر مطابق با شکل ۵ تشکیل باند دادند.

در مطالعه Saleh و همکاران (۲۰۲۴)، سی و سه جدایه باکتریایی مختلف جمع آوری و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PCR از نظر بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و مولکولی شناسایی شدند. شناسایی مولکولی جدایه‌های بیفیدوباکتریوم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. از چهار آغازگر اختصاصی مختلف استفاده شد. اولین پرایمر (g-bifid) یک پرایمر عمومی برای شناسایی جنس Bifidobacterium بود. از بین ۳۳ جدایه جمع آوری شده، تنها ۱۳ جدایه با این آغازگر واکنش داده و نواری در اندازه‌های بین ۵۴۹ جفت باز تا ۵۶۳ جفت باز تولید کردند. آزمایشات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی نشان داد که ۱۳ جدایه به عنوان بیفیدوباکتری شناسایی شدند. بیشترین تعداد ایزوله از انواع ماست‌ها به دست آمد که درصد آن به حدود ۴۳ درصد رسید و پس از آن انواع مختلف شیر که درصد ایزوله‌ها به ۳۰ درصد رسید. در رتبه سوم عسل قرار دارد که درصد جدایه‌ها به ۱۲ درصد و در نهایت سویا به ۹ درصد رسید (Saleh et al., 2024). در مطالعه حاضر هم شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد که درصد بیفیدوباکتریوم مشاهده شده در ماست و پنیر صنعتی پروبیوتیک به ترتیب ۴۴/۴ و ۱۰۰ درصد و در ماست و پنیر سنتی به ترتیب ۹۰/۹ و ۸۵/۷ درصد بود.

در مطالعه Malini و Raghav (۲۰۲۱)، نمونه‌های شیر شتر تولید شده در مزرعه ایالت راجستان هند برای

[1] mupirocin lithium salt

جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک LAB جمع آوری شد. فرآیند جداسازی توسط نمونه غنی شده روی محیط کشت MRS آگار تکمیل شد و باکتری‌های جدا شده در شرایط بی هوازی ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. کشت‌های باکتریایی جدا شده با استفاده از روش توالی‌یابی DNA مشخص و شناسایی شدند. روش شناسایی بستگی به شباهت توالی ژن ۱۶S rRNA دارد. پس از غربالگری آزمایشگاهی، از ۱۱ نمونه شیر شتر و ۵ نمونه شیر خام، ۴۰ سویه گرم مثبت، اکسیداز منفی و باکتری کاتالاز منفی و غیر اسپورساز که به عنوان سویه باکتری اسید لاکتیک در نظر گرفته شدند، جداسازی شدند. جدایه‌ها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و بیولوژیکی به پنج جنس LAB به شرح زیر تمایز یافتند: انتروکوک، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم. DNA جدا شده با پرایمر اختصاصی ۱۶S rRNA(1492R و 8F) تکثیر شد (Malini and Raghav, 2021). این مطالعه حضور LAB را در شیر شتر تایید کرد. در مطالعه حاضر از محیط کشت TOS-MUP برای جداسازی بیفیدوباکتریوم در محصولات ماست و پنیر سنتی و صنعتی استفاده شد؛ بنابراین در این مطالعه، برخلاف مطالعه Malini و Raghav (۲۰۲۱)، فقط بیفیدوباکتریوم شناسایی شد. ژن استفاده شده در هردو مطالعه یکسان بود، اما از پرایمرهای متفاوتی استفاده شد.

از آنجایی که هیچ یک از روش های مبتنی بر کشت به اندازه کافی برای شناسایی بیفیدوباکتری‌ها انتخابی نیستند، باید از PCR – یک تکنیک مولکولی که به دلیل کارایی، سرعت و دقت بالا شناخته شده است – برای تأیید تعلق سویه‌های جدا شده به جنس بیفیدوباکتریوم استفاده شود. با توجه به مطالعات انجام شده، شناسایی بیفیدوباکتریوم از انواع محصولات مانند: ماست، پنیر، شیر، کشک زرد، روغن و کره و عسل؛ با روش PCR به وسیله‌ی ژن‌های مختلفی از جمله 16S rRNA، tuf، hsp60 و سایر ژن‌ها و انواع پرایمرها انجام می‌شود. در مطالعه حاضر، باکتری‌های بیفیدوباکتریوم، از ماست و پنیر پروبیوتیک صنعتی و ماست و پنیر سنتی ۳ شهر خراسان رضوی با استفاده از کشت و روش PCR، ژن ۱۶SrRNAجداسازی و شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری

جداسازی موفقیت‌آمیز بیفیدوباکتریوم‌ها از ماست و پنیر سنتی نشان می‌دهد که این محصولات ممکن است به عنوان منابع امیدوارکننده‌ای از سویه‌های پروبیوتیک عمل کنند. در آینده، بررسی سویه‌های بومی می‌تواند توسعه کشت‌های آغازگر منطقه‌ای را که با میکروفلور دستگاه گوارش جمعیت محلی سازگارتر هستند، تسهیل کند. با این حال، توجه به این نکته مهم است که گونه‌های موجود در محصولات لبنی ممکن است متفاوت از گونه‌های طبیعی موجود در میکروبیوتای انسان رفتار کنند. مطابق با یافته‌های این مطالعه، سویه‌های پروبیوتیک بومی متنوعی نیز ممکن است از محصولات لبنی سنتی در سایر استان‌ها جدا شوند. پس از جداسازی و کشت، این سویه‌ها می‌توانند در کاربردهای صنعتی، از جمله تولید لبنیات تجاری، مورد استفاده قرار گیرند. تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌تواند از کاربرد تکنیک‌های اضافی مبتنی بر PCR یا روش‌های پیشرفته تعیین توالی بهره‌مند شود. با توجه به تعداد محدود مطالعات انجام شده در زمینه جداسازی و شناسایی گونه‌های بیفیدوباکتریوم از محصولات لبنی در استان خراسان رضوی، تحقیقات جامع‌تری برای شناسایی کامل این سویه‌ها در سطح گونه و ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی آنها مورد نیاز است.

سپاسگزاری

از معاونت غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دانشگاه علوم پزشکی گناباد به خاطر در اختیار قراردادن امکانات پژوهشی این تحقیق، تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

Abiri, R., Aliabadi, M., Kadivarian, S., Borji, S., Moradi, J. & Alvandi, A. (2021). Potentially probiotic bacteria isolated from preparation stages of Kermanshahi traditional fat. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 15, 352-360.

Ebogie, O. O. (2016). *A comparison of Probiotic and Standard yogurt based on branding (premium and basic brands), consumer preference, sensory evaluation,*

microbiological and nutritional analysis. University of Central Lancashire.

Elobaid, R., Kaur, B. & Vijayalakshmi, N. (2020) .Isolation and identification of Bifidobacterium from dairy products and screening its antibacterial activity. *Quest International Journal of Medical and Health Sciences,* 3**,** 38-43.

Fontana, L., Bermudez-brito, M., Plaza-diaz, J., Munoz-quezada, S. & GIL, A .(2013) . Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British journal of nutrition,* 109**,** S35-S50.

Ho, P. H., Pham, T. A., Truong, Q. P., Nguyen, L. H., Nguyen, T. T., Dam, H. T., Nguyen, C. N., Nguyen, H. A., Phi, Q. T. & Nguyen, H. A .(2022) .Isolation, identification and characterization of beneficial microorganisms from traditional fermented foods. *Probiotics, Prebiotics and Synbiotics: Technological Advancements Towards Safety and Industrial Applications***,** 14-56.

Hotel, A. C. P. & Cordoba, A. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention,* 5**,** 1-10.

ISO (2024). ISO 29981: 2024 [IDF 220: 2024] Milk products — Enumeration of bifidobacteria — Colony-count technique. 2 ed.

Kim, H.-B., Kim, E., Yang, S.-M., Lee, S., Kim, M.-J. & Kim, H.-Y. (2020). Development of real-time PCR assay to specifically detect 22 Bifidobacterium species and subspecies using comparative genomics. *Frontiers in Microbiology,* 11**,** 569822.

Koushki, V., Vatandost, J., Mortazavi, S. A., Jannatabdi, A. & Hosseini, S. A. (2014). Isolation, biochemical and molecular identification of probiotic bacteria from traditional dairy products of Sabzevar. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences***,** 726–737.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (2004). Brock. Biología de los microorganismos.

Malini, N. & Raghav, P. K. (2021). Isolation and identification of potential probiotic lactic acid bacteria (Lactobacillus casei and Bifidobacterium) from raw and fermented camel milk during storage. *Journal of Postharvest Technology,* 9**,** 40-46.

Mashak, Z. (2016). Identification of Bifidobacterium Strains Isolated from Kashk-e Zard: A Traditional Iranian Fermented Cereal-Dairy Based Food.

Mianzhi, Y. & Shah, N. P. (2017). Contemporary nucleic acid-based molecular techniques for detection, identification ,and characterization of Bifidobacterium. *Crit Rev Food Sci Nutr,* 57**,** 987-1016.

Perry, J. J. & Staley, J. T. (1997). Microbiology: dynamics and diversity. *(No Title)*.

ROY, D. 2001. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products .*Int J Food Microbiol,* 69**,** 167-82.

Saleh, N. Z., Saleh, F. M., Eldrwy, Y., Fasil, R. & Elfarash, A. E. (2024). Molecular Characterization and Genetic Improvement of Some Bifidobacterium Isolates for Yogurt Manufacture use. *Assiut Journal of Agricultural Sciences,* 55**,** 111-121.

Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Smidt, H., Saarela, M., Mättö, J. & De vos, W. M. (2003). Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Systematic and applied microbiology,* 26**,** 572-584.

Saxelin, M., Korpela, R. & Mäyrä-Mäkinen, A. (2003). Introduction: classifying functional dairy products. *Functional dairy products***,** 1-16.

Taye, Y., Degu, T., Fesseha, H. & Mathewos, M. (2021). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Cow Milk and Milk Products. *ScientificWorldJournal***,** 4697445.

Tesfaye, W., Suarez-lepe, J., Loira, I., Palomero, F. & Morata, A. (2019). Dairy and nondairy-based beverages as a vehicle for probiotics, prebiotics, and symbiotics: Alternatives to health versus disease binomial approach through food. *Milk-based beverages.* Elsevier.

Food Technology & Nutrition / Spring 2025 / Vol. 22 / No. 2

Isolation of Bifidobacteria and Their Molecular Identification in Various Types of Industrial and Traditional Yogurt and Cheese

S. Sabeti[a*], M. Khezri[b], D. Salarbashi[c*], E. Nattagh-Eshtivani[d]

[a] M. Sc. Student of the Department of Food Science and Nutrition, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran.

[b] Assistant Professor of Food Microbiology Department of Food Control Laboratory, Food and Drug Vice Presidency, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

[c] Associate Professor of the Department of Food Science and Nutrition, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran.

[d] Assistant Professor of the Department of Food Science and Nutrition, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran.

Received: 27 June 2025 Accepted: 22 September 2025

Abstract

Introduction: Probiotics are live, non-pathogenic microorganisms that are administered to improve microbial balance, especially in the gastrointestinal tract. Bifidobacterium is one of the most important groups of probiotics that is widely used in the food industry due to its health-promoting benefits. Yogurt and cheese are important components of the diet. However, a review of the literature showed that there are insufficient studies on the isolation of probiotics, especially Bifidobacterium, from industrial and traditional probiotic yogurt and cheese produced in specific cities of Khorasan Razavi. Therefore, the present study aimed to isolate and identify Bifidobacterium in these products using culture and PCR methods.

Materials and Methods: A total of 20 yogurt samples and 10 cheese samples were collected. Traditional products were collected from the cities of Mashhad, Neyshabur, and Gonabad in Khorasan Razavi province. Each sample was diluted, homogenized, and cultured in a specific TOS culture medium. Bifidobacteria were identified using the colony counting technique according to the international standard method ISO 2024: (220 IDF) 29981, which was based on cell morphology and Gram staining of the indicator colonies. Then, polymerase chain reaction (PCR) methods were used for the final confirmation of these isolates.

Results: After anaerobic cultivation of the samples on the TOS specific culture medium, bifidobacteria with irregular, rod-shaped or branched morphology were observed in most of the traditional and industrial samples. The abundance of Bifidobacterium in TOS medium for industrial probiotic yogurt and cheese was 44.4% and 100%, respectively, and in traditional yogurt and cheese, 90.9% and 85.7%.

Conclusion: Isolation of Bifidobacterium from traditional yogurt and cheese showed that these traditional products are a promising source of probiotic strains. In the future, investigation of indigenous strains may lead to the introduction of regional starters that are more compatible with the intestinal microflora of the local population. However, species determination requires further sequencing and investigation.

Keywords: *Bifidobacterium, Cheese, PCR, Yogurt.*

* Corresponding Author: sabetis1994@gmail.com, Davoud.salarbashi3@gmail.com

علوم غذایی و تغذیه / بهار ۱۴۰۴ / سال بیست و دوم / شماره ۲