شناسایی و تعیین هویت مولکولی فلور میکروبی عامل تخمیر دو نمونه خمیر نان‌های سنتی تولیدی در استان کرمان

محدثه تجلی[۱]، محمدمهدی متقی*[۲]، اشرف کریمی‌نیک[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

* نویسنده مسئول: motaghi.mehdi@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۳/۱۵، پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۶/۲۵

چکیده

فلور میکروبی خمیرترش عموماً حاوی مخمرها و باکتری‌های اسید لاکتیک بوده و اثر متقابل این میکروارگانیسم‌ها حائز اهمیت است. باکتری‌های اسید لاکتیک در طی تخمیر خمیرترش متابولیت‌های بی‌شماری را همچون اسیدهای آلی، آنزیم‌ها و اگزوپلی ساکاریدها را تولید می‌کنند که بر ساختار و خصوصیات رئولوژیکی خمیر و در نتیجه کیفیت بافت و بیاتی نان حاصل اثر مثبت دارند. هدف از تحقیق حاضر، شناسایی و مقایسه فلور میکروبی خمیر نان‌های سنتی شهرستان‌های مختلف استان کرمان به روش کشت و مولکولی بود. محیط کشت‌های ام‌آراس و سابرودکستروزآگار به ترتیب جهت جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک و مخمرها استفاده گردید. آزمون‌های بیوشیمیایی و ضد میکروبی انجام شد. ۴ جدایه از باکتری‌ها و ۴ جدایه از مخمرها به ترتیب با استفاده از روش مولکولی و مقایسه توالی‌های حاصل باتوالی‌های موجود در بانک ژن شناسایی گردید. گونه‌های باکتری عبارت بودند از *ویسلاسیبریا*، *آسینتوباکتربائومانی*، *پدیوکوکوس پنتوزئوس* و *استافیلوکوکوس گالیناروم* و مخمرها *ساکارومایسس سرویزیه* و *کاندیدا تروپیکالیس* بودند. بر اساس نتایج حاصله می‌توان میکرواورگانیسم‌های شناسایی شده در این تحقیق را جهت بالا بردن کیفیت نان و ایجاد طعم و آرومای بهتر نان پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی: خمیر ترش، فلور میکروبی، هویت مولکولی

مقدمه

امروزه محصولات تغذیه‌ای به دلیل انبوهی از ویژگی‌های مثبت به ویژه غذاهای کاربردی با خواص پروبیوتیک مانند شیرهای تخمیری حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمر و مایه خمیر نان مورد توجه قرار گرفته اند. تخمیر گندم می‌تواند مزایای سلامتی و غذایی اضافی از جمله تهیه پروبیوتیک میکروب‌ها را فراهم کند. تخمیر خمیر ترش با خواص ضد قارچی و ضد باکتری نیز همراه است که می‌تواند ماندگاری و کیفیت نان، از جمله فراهم آوردن ویژگی‌های جذاب ارگانولپتیک را بهبود بخشد (۱). سابقه تولید خمیر ترش به زمان باستان بر می‌گردد. محصولاتی که با خواص مطلوب مربوط به خود با عطر و طعم منحصر به فرد، عمر مفید افزایش یافته و ارزش تغذیه‌ای تعیین می‌شود (۲). از نظر میکروب‌شناسی خمیر ترش یک اکوسیستم خاص و پر تنش است که توسط pH پائین مشخص، غلظت کربوهیدرات بالا، محدودیت اکسیژن و تعداد سلول‌های باکتری ($\geq 10^8$ (CFU/g)) در مقایسه با تعداد مخمرها ($\leq 10^7$ (CFU/g)) مشخص می‌شود (۳). در خمیر ترش مخمرها و باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)، *لاکتوباسیل*‌های عمدتاً تخریب‌ناپذیر وجود دارد. بر اساس تلقیح آن‌ها، سه نوع فرآیند تخمیر مایه ترشی را می‌توان تشخیص داد، یعنی فرآیندهای برگشتی، آن‌هایی که با کشت‌های آغازین شروع شده‌اند و آن‌هایی که با یک کشت شروع‌کننده و به دنبال آن بازگشت به عقب وجود دارند (۴). در زمان نگهداری خمیر، تخمیر لاکتیک با رشد و تکثیر باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در آرد و فعالیت متابولیکی آن‌ها صورت گرفته و گزینش و تکثیر مخمرهای آرد نیز رخ می‌دهد (۵). علاوه بر این، مجموعه‌ای از عوامل ذاتی و خارجی ممکن است بر ترکیب میکروبیوتای خمیر ترش تأثیر

بگذارد. به عنوان مثال، نفوذ آرد (نوع، کیفیت، و غیره) و پارامترهای فرآیند (دما، pH، عملکرد خمیر، روش‌های برگشت و غیره) نیز تاثیرگذار است (۶). میزان طبیعی باکتری‌های لاکتیک و مخمرهای خمیر مایه مسئول ور آمدن خمیر نان به علت تولید گاز دی‌اکسید کربن است (۵). همه این متابولیت‌ها مزایای زیادی در نان دارند. سیستم‌های پروتئولیتیک فعالیت‌های پروتئیناز و پپتیداز می‌توانند غلظت اسید آمینه آزاد را در طول تخمیر مایه ترش افزایش دهند. این روش‌های بیوشیمیایی منجر به بهبود ترکیبات فرار می‌شود زیرا بسیاری از اسیدهای آمینه آزاد به عنوان ترکیبات پیش‌ساز برخی از ترکیبات فرار در نظر گرفته می‌شوند (۶). مطالعات میکروبیولوژی نشان داده که فلور میکروبی مشخص متشکل از ۴۳ گونه از باکتری‌های اسید لاکتیک و عمدتاً گونه *لاکتوباسیلوس* و بیش از ۲۳ گونه از مخمرها به ویژه *ساکارومایسس* و *کاندیدا* می‌باشد (۵). مخمرهای جدا و شناسایی شده از انواع خمیرمایه حاصل از آرد گندم عبارتند از: *ساکارومایسس سرویزیه*[1] ،*کاندیدا کازئی*[2]، *ساکارومایسس اینوسیتاس*[3]، *ترولوپیسس کوآاکولاز*[4]، *ترولوپیسس کاندیدا*[5]، *کاندیدا اسلاتا*[6]، *کاندیدا میلر*[7]، *کاندیدا بوئیدنی*[8]، *کاندیدا گوییلرموندی*[9]، *رودوتلا گلوتینیس*[10]، *فیچیا پلیمورفا*[11]، *تریکوپورون مارگاریتیفروم*[12]، *فیچیا نوروگنسیس*[13]، *هنسینولا آنومالا*[14] و *کاندیدا هولمی*[15] می‌باشند (۷). در این پژوهش فلور میکروبی خمیر ترش‌های سنتی استان کرمان بررسی و با شناسایی باکتری‌ها و مخمرهای موجود در خمیر نان‌های سنتی به مقایسه آن‌ها پرداخته شده است. از آن جا که جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* مورد بررسی در این پژوهش از خمیرترش‌های موجود در منطقه کرمان جدا و خالص‌سازی شده‌اند پس احتمال دستیابی به ایزوله‌های جدیدتری از *لاکتوباسیلوس*‌ها با خواص متفاوت‌تری نیز وجود دارد. با این هدف می‌توان به جدایه‌های با خواص تکنولوژیکی مناسب جهت تولید نان با کیفیت مطلوب و ثابت دست یافت. جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* منتخب در انتقال عطر و طعم نان سنتی به نان‌های صنعتی نقش داشته و با افزایش زمان ماندگاری نان و به تاخیر انداختن بیاتی باعث کاهش ضایعات نان در کشور خواهند شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق از نوع تجربی و آزمایشگاهی است. تعداد دو نمونه خمیر ترش سنتی استان کرمان طبق اطلاعات جمع‌آوری شده و نمونه‌گیری هدفمند انتخاب شد. نمونه اول از خمیر ترش سنتی منطقه راور و نمونه دوم از خمیر ترش سنتی منطقه نگار انتخاب و بلافاصله با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل گردید. جهت تهیه رقت، ۱۰ گرم از نمونه مورد آزمایش را با ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل به صورت سوسپانسیون درآورده که جهت مخلوط و یکدست شدن سوسپانسیون، از انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰rpm به مدت یک ساعت استفاده شد. سپس رقت‌های 10^{-1}-10^{-6} از هر نمونه برای تهیه کشت فراهم شد. از سه رقت آخر بر روی محیط‌های ام‌آراس آگار برای جداسازی *لاکتوباسیلوس*‌ها و محیط کشت سابرودکستروز آگار برای جداسازی مخمرها کشت داده شد. کشت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در جار شمعی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از رشد، از هر جدایه رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های کاتالاز و اکسیداز به عمل آمد. جهت بررسی تخمیر قندها از محیط کشت فنل رد براث به همراه یک درصد از هر کربوهیدرات شامل رامنوز، گزیلوز، گلوکز، فروکتوز، ساکارز، مالتوز، مانوز، گالاکتوز، میواینوزیتول استفاده شد. بررسی فعالیت آمیلولیتیکی جدایه‌ها با استفاده از محیط کشت استارچ آگار و فعالیت پروتئولیتیکی با کشت روی محیط اسکیم میلک آگار انجام گرفت (۸). پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط ۵ درصد دی‌اکسید کربن گرمخانه‌گذاری

[1] *Saccharomyces cerevisiae*
[2] *Candida krusei*
[3] *Saccharomyces inusitas*
[4] *Torulopsis collucolasa*
[5] *Torulopsis candida*
[6] *Candida stellata*
[7] *Candida miller*
[8] *Candida boidinii*
[9] *Candida guilliermondii*
[10] *Rhodotorula glutinis*
[11] *Pichia polymorpha*
[12] *Tricosporon margaritiferum*
[13] *Pichia norvegensis*
[14] *Hansenula anomala*
[15] *Candida holmii*

شدند. به منظور بررسی فعالیت آنتاگونیستی *لاکتوباسیلوس‌ها* از روش کشت دو لایه‌ای استفاده گردید. در این روش از هر باکتری پاتوژن در محیط مایع هینتون براث کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. از هر جدایه *لاکتوباسیلوس* بصورت نقطه‌ای بر روی محیط کشت ام‌آراس آگار با نیدل استریل تلقیح شد. به این ترتیب در چهار گوشه پلیت با فاصله از لبه پلیت، از چهار محل مجزا تلقیح انجام گرفت. پلیت‌ها بمدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و روز بعد، پس از تشکیل کلنی در نقاط تلقیح شده استفاده شدند. محیط کشت مولر هینتون آگار با ۰/۵ درصد آگار (نیمه جامد) در لوله‌های آزمایش نیز به طور جداگانه تهیه و استریل شد. زمانی که دمای لوله‌ها به ۴۲ درجه سانتی‌گراد رسید (قبل از انعقاد محیط) به هر لوله ۰/۱ میلی‌لیتر از باکتری‌های پاتوژن با تراکم 5×10^{7} CFU/ml اضافه شد. لوله‌ها بلافاصله شیکر شده تا نمونه باکتری با محیط کاملاً مخلوط گردیده و سپس به آرامی در سطح محیط ام‌آراس آگار تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس* ریخته شد. پس از پخش یکنواخت محیط حاوی باکتری و انعقاد آن، پلیت‌ها بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (۶).

تعیین هویت مولکولی جدایه برتر از باکتری‌ها

چهار جدایه که فعالیت آنزیمی و آنتاگونیستی بیشتری نسبت به جدایه‌های دیگر داشتند به عنوان جدایه برتر، جهت تعیین هویت مولکولی انتخاب شدند. از نمونه‌های میکروبی کشت خالص در محیط مایع تهیه گردید و استخراج DNA با کیت Dyna Bio، ایران طبق دستورالعمل آن صورت پذیرفت (۶).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

در این مطالعه به منظور تکثیر ناحیه 16S rRNA باکتری هدف از پرایمرهای عمومی (F:5'-AAGTAA TAG و R:5'-TCT TAG CCT ATC; CGC GTC GTC-3) استفاده گردید. واکنش پی‌سی‌آر با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر، ۰/۲ میکرومولار dNTP، ۲ میکرومولار $MgCl_2$، ۵/۲ میکرولیتر بافر پی‌سی‌آر و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase انجام گردید. در ادامه واکنش پی‌سی‌آر در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. در نهایت محصول پی-سی‌آر به ژل آگارز ۱ درصد منتقل و به مدت ۱ ساعت در ولتاژ ۸۰ ولت، الکتروفورز گردید (۹ و ۱۶).

تعیین توالی محصول پی‌سی‌آر و شناسایی نهایی جدایه برتر

۲۰۰ میکرولیتر از محصول پی‌سی‌آر برای تعیین توالی قطعات تکثیر شده به شرکت تکاپوزیست جهت ارسال به شرکت بیونیر کره جنوبی ارسال گردید. سپس توالی‌های ارسال شده با نرم‌افزار کدون کد آلاینر[1] بررسی و پس از بلاست کردن در سایت NCBI، سویه مورد نظر شناسایی گردید.

تعیین هویت مولکولی جدایه برتر از مخمرها

با توجه به نتایج، چهار جدایه که فعالیت آنتاگونیستی و آنزیمی بالاتری نسبت به جدایه‌های دیگر داشتند به عنوان جدایه برتر، جهت تعیین هویت مولکولی انتخاب و به روش ذیل شناسایی آن‌ها انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (پی‌سی‌آر)

برای تکثیر ژن 16S rRNA باکتریایی از پرایمر-های (ITS1: (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'

[1] CodonCode Aligner

و ITS2: (5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC3') به عنوان جفت پرایمر جهت دستیابی طول تقریبی bp ۱۵۰۰ توسط پی‌سی‌آر استفاده شد. ژن 16s rDNA باکتری جدا شده با استفاده از برنامه دمایی زیر تکثیر شد. واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۸۰ ثانیه انجام شد. واسرشت بعدی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۶۰ ثانیه و به تعداد ۲۵ سیکل انجام شد. انیلینگ به مدت ۴۵ و در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. گسترش[1] اولیه در ۹۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی در ۳۰۰ ثانیه و در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. این واکنش در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری انجام شد. کنترل منفی نیز مطابق همین دستورالعمل تهیه گردید. با این تفاوت که به جای DNA الگو از آب تزریقی به کار رفته در مراحل تهیه DNA الگو استفاده شد (۹ و ۱۶).

الکتروفورز و شناسایی جدایه‌های برتر

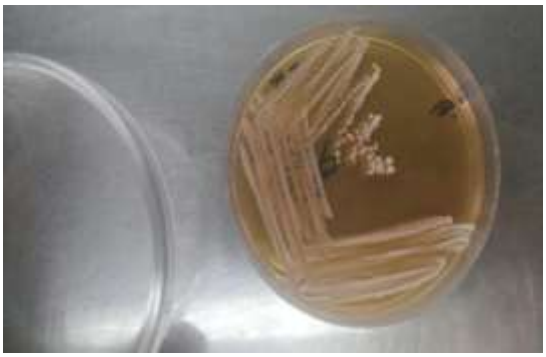
پس از پایان یافتن واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، محصول واکنش توسط ژل آگارز (۱٪) با استفاده از محلول بافری (تریس- استات- EDTA) بافر 1XTAE در دمای اتاق الکتروفورز گردید. مارکر مورد استفاده در این تحقیق DNA لدر ساخت شرکت سیناکلون با فاصله ۱۰۰ جفت باز از ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز بود. سپس ظرف محتوی ژل آگارز طوری درون تانک الکتروفورز قرار داده شد که چاهک‌ها در ظرف قطب منفی تانک قرار گیرند. تانک را به جریان الکتریسیته متصل کرده و ولتاژ روی ۱۰۰ تا ۱۱۰ تنظیم شد. پس از ۴۰ دقیقه ژل بررسی شده و از میزان رنگی که در ژل پیشروی کرده زمان پایان الکتروفورز تخمین زده شد. پس از پایان مرحله الکتروفورز ژل را از بافر خارج و در دستگاه ژل داک قرار داده و ضمن مشاهده باندها در مقایسه با لدر با دوربین عکس گرفته و ذخیره-سازی انجام شد.

[1] Extension

یافته‌ها

کشت نمونه‌های خمیر ترش

نتایج کشت نمونه‌های خمیر روی محیط کشت‌های ام‌آراس آگار و سابرودکستروز آگار در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. مورفولوژی جدایه‌ها در جدول ۱ مشخص شده است.



شکل ۱- کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط ام‌آراس آگار

شکل ۲- کلنی‌های مخمری رشد کرده بر روی محیط سابرودکستروز آگار

تست کاتالاز

روی ۱۵ سویه جدا شده از محیط ام‌آراس آگار آزمون کاتالاز انجام شد (۷) و هر سویه که باعث آزاد شدن حباب در لوله شدند بصورت مثبت (+) و سویه-های دیگر بصورت منفی (-) در جدول ۱ گزارش گردید.

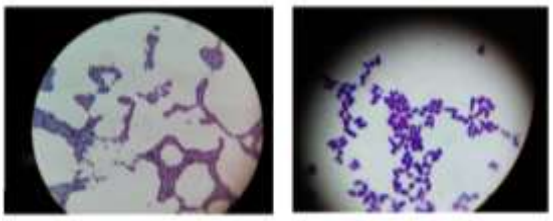
تست اکسیداز

روی ۱۵ سویه جدا شده از محیط‌های ام‌آراس آگار آزمون اکسیداز انجام گرفت. هر سویه‌ای که باعث تغییر رنگ دیسک اکسیداز از بی‌رنگ به ارغوانی بعد طی مدت

۱۰ ثانیه شد بصورت مثبت (+) در جدول ۱ گزارش گردید (۷).

تست گرم

سویه‌های جدا شده از هر دو محیط ام‌آراس آگار و سابرودکستروزآگار توسط رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی شدند و توسط میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برای باکتری‌ها و بزرگنمایی ۴۰۰ برای مخمرها مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۳). نتایج در جدول ۱ به صورت مثبت (گرم مثبت) و منفی (گرم منفی) گزارش داده شد.



(الف) (ب)

شکل ۳- (الف) نمونه‌ای از رنگ‌آمیزی مخمرها، (ب) نمونه از رنگ‌آمیزی باکتری ها

از ۱۵ سویه جدا شده ۶ سویه توانایی رشد در محیط حاوی نشاسته برنج را دارا بودند که در محیط کشت به صورت هاله‌ای روشن اطراف پرگنه باکتری مشخص می‌شد (۸). نتایج بر اساس شدت و ضعف فعالیت آمیلولیتیک در جدول شماره ۱ آورده شده است.

آزمون پروتئولیتیک: نتایج در محیط اسکیم میلک منفی و در نتیجه فعالیت پروتئولیتیکی منفی گزارش گردید.

تست تخمیر قندی: در این پژوهش برای بررسی تخمیر قند توسط سویه‌ها از محیط فنل رد براث به همراه قندهای انتخابی استفاده شد. محیط‌های رشد کرده پس از ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. سویه‌های که باعث تخمیر قند مورد نظر شده بودند باعث تغییر رنگ محیط از صورتی به زرد شده بودند. نتایج بصورت مثبت (تغییر رنگ به زرد) و منفی (بدون تغییر) در جدول شماره ۲ گزارش شدند.

نتایج خاصیت آنتاگونیستی باکتری‌های به دست آمده بر روی ۵ باکتری پاتوژن عامل مسمویت غذایی با چندین روش مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه به صورت مثبت (تشکیل هاله عدم رشد) و به صورت منفی (عدم تشکیل هاله) در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

جدول ۱- بررسی مورفولوژی و ویژگی‌های بیوشیمیایی ارگانیسم‌های جدا شده از نمونه‌های خمیر ترش

نام	منطقه جمع‌آوری	مورفولوژی	کاتالاز	اکسیداز	گرم	آمیلولیتیک	پروتئولیتیک
B_1	راور	کلنی‌های کرمی رنگ محدب لزج	+	+	گرم مثبت، مخمر بدون جوانه	-	-
D_1	نگار	کلنی‌های شیری رنگ محدب	+	+	گرم مثبت، مخمر بدون جوانه	-	-
G_1	نگار	کلنی‌های ریز سفید	-	-	گرم منفی، کوکوباسیل	+	-
H_1	راور	کلنی‌های سفید ریز	-	-	گرم مثبت، کوکسی ریز	+	-
I_1	راور	کلنی‌های محدب شیری رنگ ریز	-	-	گرم مثبت، دیپلوکوک	++	-
J_1A	نگار	کلنی‌های کدر صاف زرد رنگ	-	-	گرم مثبت، باسیل (دیپلوباسیل)	-	-
K_1A	راور	کلنی‌های سفید صاف	-	-	گرم مثبت، باسیل (دیپلوباسیل)	+	-
K_1B	راور	کلنی‌های بزرگ شیری رنگ لزج‌مانند	+	+	گرم مثبت، مخمر جوانه‌دار	-	-

L_1A	نگار	کلنی‌های ریز زرد رنگ	-	-	گرم مثبت، کوکسی (دیپلوکوک)	-	-
L_1B	نگار	کلنی‌های شیری رنگ محدب	-	-	گرم مثبت، باسیل (دیپلوباسیل) بدون اسپور	+	-
M_1A	نگار	کلنی‌های زرد رنگ لزج‌مانند	+	+	گرم مثبت مخمر، بدون جوانه	-	-
N_1A	راور	کلنی سفید محدب	-	-	گرم مثبت، باسیل بدون اسپور	-	-
N_1B	راور	کلنی ریز شیری رنگ	-	-	گرم مثبت، باسیل (دیپلوباسیل)	-	-
O_1A	راور	کلنی درشت کرمی رنگ محدب	+	+	گرم مثبت، مخمر بدون جوانه	-	-
O_1B	راور	کلنی‌های سفید رنگ ریز	-	-	گرم مثبت، باسیل (دیپلوباسیل)	-	-
P_1	راور	کلنی‌های سفید رنگ محدب	+	-	گرم مثبت، کوکسی خوشه‌ای	-	-
P_1A	راور	کلنی‌های بزرگ سفید لزج‌مانند	+	+	گرم مثبت، مخمر جوانه-دار	-	-
Q_1A	نگار	کلنی‌های سفید محدب لزج	+	+	گرم مثبت، مخمر بدون جوانه	-	-
Q_1B	نگار	کلنی‌های شفاف محدب	-	-	گرم مثبت، باسیل (دیپلوباسیل)	+	-
R_1A	نگار	کلنی‌های مدب سفید لزج	+	+	گرم مثبت، مخمر بدون جوانه	-	-
R_1B	نگار	کلنی‌های شفاف بی-رنگ با لبه‌های صاف	-	-	گرم مثبت، باسیل (دیپلوباسیل)	+	-

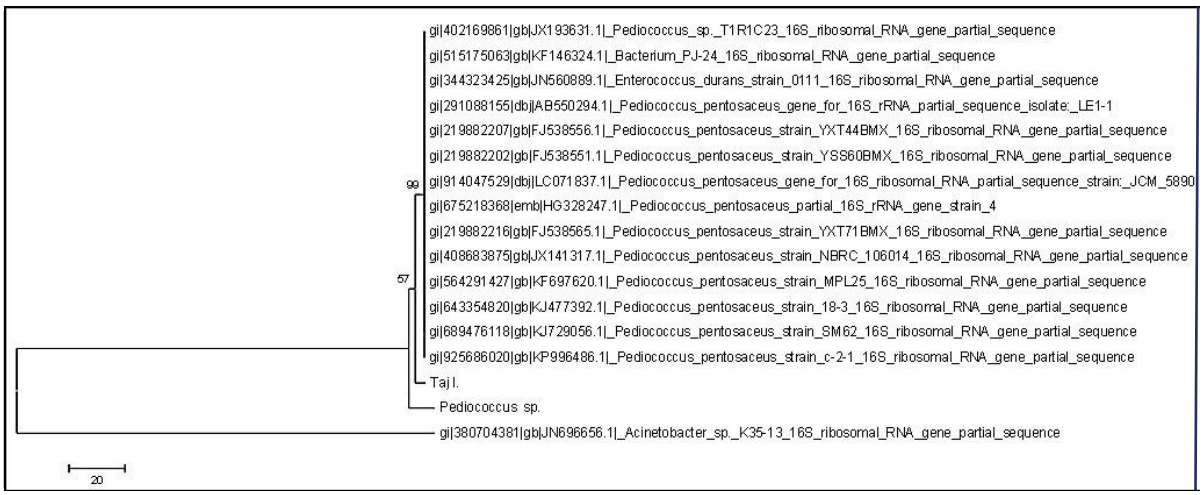
-، + و ++ به ترتیب نشانه عدم فعالیت، فعالیت آمیلولیتیکی ضعیف و قوی می‌باشد.

جدول شماره ۲- نتایج تست تخمیر قند ارگانیسم‌های جدا شده از نمونه‌های خمیر
(علامت + نشانه تخمیر و - نشانه عدم تخمیر قند است)

	رامنوز	گزیلوز	گلوکز	فروکتوز	ساکارز	ریبوز	مالتوز	مانوز	گالاکتوز	میواینوزیتول
B_1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D_1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G_1	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
H_1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
I_1	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
J_1B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K_1A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K_1B	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
L_1A	+	+	+	_	-	-	-	-	-	-
L_1B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M_1A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N_1A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N_1B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O_1A	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
O_1B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P_1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P_1A	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Q_1A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Q_1B	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
R_1A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_1B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

جدول شماره ۳- نتایج بررسی خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌های بدست آمده از نمونه‌های خمیر بر علیه ۵ باکتری پاتوژن

جدایه‌ها	استافیلوکوکوس آرئوس	اشرشیاکلی	باسیلوش سرئوس	سالمونلاانتریکوم	لیستریا مونوسایتوژنز
G_1	+	-	+	-	+
H_1	-	-	-	-	-
I_1	+	-	+	-	+
J_1B	-	-	-	-	-
K_1A	-	-	-	-	-
L_1A	-	-	-	-	-
L_1B	-	-	-	-	-
N_1A	-	-	-	-	-
N_1B	-	-	-	-	-
O_1B	-	-	-	-	-
P_1	+	-	+	-	+
Q_1B	+	-	+	-	+
R_1B	-	-	-	-	-



شکل ۴- نتایج درخت فیلوژنی جدایه Q_1B مربوط به باکتری ویسلا سیبری[1]

جدول شماره ۴- نتایج مقایسه Blast باکتری‌ها با توالی‌های مربوط به ژن 16s rRNA موجود در بانک ژن

نمونه	ارگانیسم	درصد تشابه	شناسه
Q_1B	gi|359805991|dbj|AB682303.1|_Weissella_sp._NBRC_106001_gene_for_16S_rRNA_partial_sequence Weissella cibaria TAJ.1	95%	96%
G_1	gi|429534142|emb|HE651910.1|_Acinetobacter_baumannii_16S_rRNA_gene_strain_16842 Taj G	95%	99%
I_1	gi|914047529|dbj|LC071837.1|_Pediococcus_pentosaceus_gene_for_16quence_strain:_JCM_5890	97%	96%
P_1	gi|575450843|gb|KF737153.1|_Staphylococcus_gallinarum_strain_TR6T2_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence gi|399226831|gb|JX114800.1|_Bacterium_LF7_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence	100%	94%

[1] *Weissella cibaria*

جدول شماره ۵- نتایج مقایسه Blast مخمرها با توالی‌های مربوط به ژن 16s rDNA موجود در بانک ژن

نمونه	ارگانیسم	درصد تشابه	شناسه
K_1B	gi|685167420|gb|KM029995.1|_Saccharomyces_cerevisiae_strain_ Saxapahaw DS1693_internal_transcribed_spacer_1_partial_sequence_5.8S_ribosomal_RNA_gene_and_internal_transcribed_spacer_2_complete_sequencee	99%	88%
B_1	Candida_tropicalis	100%	96%
P_1A	gi|685167420|gb|KM029995.1|_Saccharomyces_cerevisiae_strain_ Saxapahaw DS1693_internal_transcribed_spacer_1_partial_sequence_5.8S_ribosomal_RNA_gene_and_internal_transcribed_spacer_2_complete_sequencee	100%	86%
O_1A	gi|349587272|gb|JF896569.1|_Candida_tropicalis_strain_ZHS1_internal_transcribed_spacer_1_partial_sequence_5.8S_ribosomal_RNA_gene_and_internal_transcribed_spacer_2_complete_sequence_and_28S_ribosomae	97%	95%

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش شناسایی میکروفلورای طبیعی خمیر ترش‌های دو منطقه از استان کرمان مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه سویه‌های بدست آمده از خمیر ترش-های سنتی منطقه با مناطق دیگر در ایران و سایر کشورها انجام شد. این پژوهش برای اولین بار در کرمان صورت گرفت. ایزوله‌های مورد بررسی در این تحقیق بطور مستقیم از خمیر ترش‌های منطقه راور و نگار کرمان جداسازی و خالص‌سازی شد و به تعداد ۴ سویه برتر از باکتری‌ها و ۴ سویه برتر از مخمرها تعیین هویت مولکولی شدند. سویه‌های برتر سویه‌هایی بودند که دارای فعالیت آنتاگونیستی و آمیلولیتیکی و پروتئولیتیکی بودند. تحقیقات دیگری در نقاط دیگر ایران به ویژه در شهرهای اصفهان، لرستان، آذربایجان شرقی انجام شده است. سعیدی در سال ۱۳۹۰ به بررسی تنوع زیستی خمیر ترش‌های مناطق بومی اصفهان پرداخت. در پژوهش خود از ۴۳ نوع خمیر ترش سنتی استفاده کرد که فقط ۳ نوع آن در محدوده مورد نظر بود. تفاوتی که وجود داشت در این پژوهش از یک محیط برای جداسازی و بررسی استفاده شد در صورتی که در پژوهش مربوط به منطقه اصفهان از ۳ نوع محیط کشت استفاده شد. در تحقیق مذکور در بخش میکروبی گروه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس رئوتری، لاکتوباسیلوس کازئی*[1]، *لاکتوباسیلوس آلیمنتاریوس*[2]، *لاکتوباسیلوس هیلگاردی*[3]، *لاکتوباسیلوس آجیلیس*[4]، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوس بوچنری، لوکونوستوک سیتروم، لوکونوستوک دکسترنیکوم*[5]، *پدیوکوکوس پنتوسئوز، لوکونوستوک مزنتروئیدس*[6] و *ساکارومایسس سرویزیه* شناسایی شدند. در بخش مولکولی با توجه به آن که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با نسبت ۲۶٪ فراوان‌ترین گونه باکتری اسید لاکتیک جداسازی شده در این مطالعه بود (۹). تحقیقی که توسط گلشن تفتی در سال ۱۳۹۲ در آذربایجان با هدف بررسی خواص تکنولوژیکی سویه‌های *لاکتوباسیلوس‌های* خمیر ترش‌های سنتی استان آذربایجان شرقی که در مطالعات قبلی جداسازی شده بودند پرداخته است. در نتایج این تحقیق آمده است که سویه‌های *لاکتوباسیلوس* در ۴ صفت دارای اختلاف معنی‌داری هستند (۱۰). آنابلا ورا[7] و همکاران به بررسی انواع محیط کشت‌های اختصاصی برای جداسازی باکتری اسید لاکتیک پرداختند. در پژوهش خود از محیط

[1] *Lactobacillus casei*
[2] *Lactobacillus alimentarius*
[3] *Lactobacillus hilgardii*
[4] *Lactobacillus agilis*
[5] *Leuconostoc dextranicum*
[6] *Leuconostoc mesenteroides*
[7] Annabelle Vera

کشت‌های MRS, maltose modified MRS, MRS5, SDB, SFM, MRS ''Vogel'', Rogosa استفاده کردند. در نتایج این تحقیق آمده است که محیط کشت‌های MRS و MRS5 مناسب‌تری می‌باشند (۱۱). مانوئل ونتوری[1] در سال ۲۰۱۲ روی *لاکتوباسیلوس سانفرانسیسنسایس*[2] جدا شده از خمیر ترش‌های سنتی پرداخت و در تحقیق ذکر شده از ۴ پروتکل برای شناسایی و جداسازی استفاده شده است. در نتایج این تحقیق آمده است که با توجه به یافته‌های دیگر، تنوع درون گونه‌ای ارتباط به مبدأ اولیه خمیر ترش دارد (۱۲). یاسمین استر[3] در تحقیق خود از خمیر ترش ۴ کشور هند، پرو، مکزیک و آلمان برای بررسی تنوع زیستی و همچنین به قصد بررسی الگوهای تخمیری استفاده کرد. در این تحقیق دو سویه مفید به دست آمده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* RTa12 و *پدیوکوکوس پنتوسازئوس*[4] RTa11 بودند. در نتایج این تحقیق ذکر شده است که *پدیوکوکوس پنتوسئوز* هموفرمنتاتیو است و قادر به تخمیر پنتوز می‌باشد. *پدیوکوکوس پنتوسئوز* توانایی تبدیل سیترات به سوکسینات و لاکتات را دارد. این سویه برای کاربردهای صنعتی مناسب است (۱۳). آنالاتانزی[5] مقایسه باکتریایی و مخمری بر روی فلور میکروبی ۱۸ خمیر ترش ایتالیایی مورد استفاده در محصولات سنتی انجام داد. این تحقیق رویکرد جامعی از فلور غالب خمیر ترش‌های مورد استفاده در ایتالیا را ارائه داده است (۱۴). النا بارتکین و همکارانش در سال ۲۰۲۰ تحقیقی با هدف جداسازی و بررسی خصوصیات فنوتیپی باکتری‌های اسید لاکتیک از خمیر مایه گندم سیاه بطور صنعتی انجام دادند. سیزده سویه *لاکتوباسیلوس* جدا و از طریق PCR در سطح گونه شناسایی شدند از جمله *لکونستوک مزنتروئیدز*[6]، *لاکتوباسیلوس برویس*[7]، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*[8]، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس فراگینیس*[9]، *پدیوکوکوس پنتازئوس*[10]، *لاکتوباسیلوس اواروم*[11]، *لاکتوباسیلوس پلنتاروم*[12]، *لاکتوباسیلوس کرواتیه*[13]، *لاکتوباسیلوس کورنیفورمینس*[14] که بیشتر جدایه‌های خمیر مایه متابولیسم کربوهیدرات همه کاره را نشان می‌داد (۶). لینا نوبارینه[15] در سال ۲۰۱۵ فعالیت فیتازی باکتری‌های اسید لاکتیک را مورد بررسی قرار داد او توانست *لاکتوباسیلوس پانیس*، *لاکتوباسیلوس رئوتری*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *پدیوکوکوس پنتوسئوز* را شناسایی کند (۱۵). ایمیلی لهومه[16] و همکارانش در سال ۲۰۱۵ روی ۱۶ خمیر ترش کشور فرانسه به تحقیق پرداختند. در تحقیق خود از pH پایین‌تری نسبت به خمیر ترش‌های ایتالیایی استفاده کردند. غلظت لاکتیک اسید و اسید استیک در مقایسه با مطالعات قبلی بالاتر از خمیر ترش‌های ایتالیایی بود. سویه‌های شناسایی شده در این مطالعه *لاکتوباسیلوس سانفرانسیس*، *لاکتوباسیلوس پارابرویس*، *لاکتوباسیلوس هامسی*[17]، *لکونستوک مسنترتروئیدس* و در گونه‌های مخمری سویه *ساکارومیسس سرویزیه* بود (۱۶). لیونا نیونلی[18] در سال ۲۰۱۴ شش خمیر ترش آلبانی را به منظور نشان دادن مناسب بودن آرد گندم آلبانیای برای پخت نان مورد بررسی قرار داد و برای این منظور فلور میکروبی از جمله باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی و مورد بررسی قرار داد. گونه‌های شناسایی شده عبارت بود از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لوکونستوک مسنترتروئیدس*، *لکونستوک سیتروئم*، *لاکتوباسیلوس لاکتیس* و *پدیوکوکوس پنتاسئوس* (۱۷). رسول و همکاران در سال ۲۰۱۹ اثر دو سویه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* را بر روی نان بربری مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از باکتری‌های لاکتیکی اثر معنی‌داری روی کاهش pH، افزایش رطوبت، افزایش حجم مخصوص، کاهش سفتی بافت، افزایش میزان اسید استیک و پروپیونیک،

[1] Manuel Venturi
[2] Lactobacillus sanfranciscensis
[3] Yasemin Sterr
[4] *P. pentosaceus*
[5] Anna Lattanzi
[6] *Leuconostoc mesenteroides*
[7] *Lactobacillus brevis*
[8] *Lactobacillus paracasei*
[9] *Lactobacillus farraginis*
[10] *Pediococcus pentosaceus*
[11] *Lactobacillus uvarum*
[12] *Lactobacillus plantarum*
[13] *Lactobacillus curvatus*
[14] *Lactobacillus coryniformis*
[15] Lina Nuobariene
[16] Emilie Lhomme
[17] *Lactobacillus hammesii*
[18] Luana Nionelli

جلوگیری از کپک‌زدگی و بهبود خواص نان بربری دارد (۱۸ و ۱۹). در خصوص باکتری‌های جدا شده در تحقیق حاضر می‌توان گفت سویه *کاندیدا تروپیکالیس* نسبت به دیگر مخمرها و باکتری *ویسلا سیبریا* و *استافیلوکوکوس گالیناروم* در تحقیقات پیشین کمتر مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. در نهایت می‌توان چنین استنتاج کرد که چنانچه خمیرترش در تخمیر نان، جایگزین مخمر نانوایی گردد، ضمن بهبود خواص کیفی خمیر، سبب ایجاد طعم و آرومای مطلوب‌تر، ممانعت از فساد قارچی و باکتریایی و تأخیر فرآیند بیاتی شده، همچنین قابلیت استفاده در آردهای فاقد گلوتن جهت مصرف مبتلایان به بیماری سلیاک را نیز فراهم می‌آورد. با رسیدن به میکروفلورای طبیعی خمیر ترش‌های سنتی می‌توان بعد از بررسی‌های ژنی و شناسایی ژن مورد نظر، از آن برای طعم و آروما در نان‌های صنعتی استفاده نمود. پیشنهاد می‌شود با بررسی و تعیین هویت فلور غالب خمیر ترش-های سنتی از آن‌ها در فناوری نانوایی صنعتی بهره برد و به یک طعم و رایحه مطلوب رسید.

سپاسگزاری

نویسندگان از کارکنان آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان کمال تشکر و امتنان را دارند.

حمایت مالی

تحقیق حاضر برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی بوده و از طرف دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان مورد حمایت مالی قرار گرفته است.

References

1-Sakandar HA, Hussain R, Kubow S, Sadiq FA, Huang W, Imran M. Sourdough bread: A contemporary cereal fermented product. Journal of Food Processing and Preservation. 2019;43(3): e13883.

2-Gänzle MG, Zheng J. Lifestyles of sourdough lactobacilli-Do they matter for microbial ecology and bread quality?. International journal of food microbiology. 2019;302:15-23.

3-De Vuyst L, Van Kerrebroeck S, Harth H, Huys G, Daniel HM, Weckx S. Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform?. Food microbiology. 2014;37(1):11-29.

4-Plessas S. Innovations in Sourdough Bread Making. Fermentation. 2021; 7(1):29.

5-Lin XB, Gänzle MG. Quantitative high-resolution melting PCR analysis for monitoring of fermentation microbiota in sourdough. International journal of food microbiology. 2014;186(1):8-42.

6-Bartkiene E, Lele V, Ruzauskas M, Domig KJ, Starkute V, Zavistanaviciute P, Bartkevics V, Pugajeva I, Klupsaite D, Juodeikiene G, Mickiene R. Lactic acid bacteria isolation from spontaneous sourdough and their characterization including antimicrobial and antifungal properties evaluation. Microorganisms. 2020;8(1):64.

7-Alfonzo A, Ventimiglia G, Corona O, Di Gerlando R, Gaglio R, Francesca N, Moschetti G, Settanni L. Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of wheat flours. Food microbiology. 2013;36(2):54-343.

8-Reddy G, Altaf MD, Naveena BJ, Venkateshwar M, Kumar EV. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation-a review. Biotechnology advances. 2008;26(1):22-34.

9-Saeedi V. Investigation of microbial biodiversity of three types of sourdoughs native to Isfahan region. 2011;

Master Thesis. School of Agriculture. Isfahan University of Technology.

10-Tafti AG, Peighambardoust SH, Hejazi MA. Biochemical characterizeation and technological properties of predominant *Lactobacilli* isolated from East-Azarbaijan sourdoughs (Iran). International Food Research Journal. 2013; 20(6):3293.

11-Vera A, Rigobello V, Demarigny Y. Comparative study of culture media used for sourdough lactobacilli. Food microbiology. 2009;26(7):33-728.

12-Venturi M, Guerrini S, Granchi L, Vincenzini M. Typing of *Lactobacillus sanfranciscensis* isolates from traditional sourdoughs by combining conventional and multiplex RAPD-PCR profiles. International journal of food microbiology. 2012;156(2):6-122.

13-Sterr Y, Weiss A, Schmidt H. Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. International journal of food microbiology. 2009;136(1):75-82.

14-Lattanzi A, Minervini F, Di Cagno R, Diviccaro A, Antonielli L, Cardinali G, Cappelle S, De Angelis M, Gobbetti M. The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods. International Journal of Food Microbiology. 2013;163(2-3):9-71.

15-Nuobariene L, Cizeikiene D, Gradzeviciute E, Hansen ÅS, Rasmussen SK, Juodeikiene G, Vogensen FK. Phytase-active lactic acid bacteria from sourdoughs: Isolation and identification. LWT-Food Science and Technology. 2015;63(1):72-766.

16-Lhomme E, Lattanzi A, Dousset X, Minervini F, De Angelis M, Lacaze G, Onno B, Gobbetti M. Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of sixteen French traditional sourdoughs. International Journal of Food Microbiology. 2015;215:70-161.

17-Nionelli L, Curri N, Curiel JA, Di Cagno R, Pontonio E, Cavoski I, Gobbetti M, Rizzello CG. Exploitation of Albanian wheat cultivars: characterization of the flours and lactic acid bacteria microbiota, and selection of starters for sourdough fermentation. Food microbiology. 2014;44(1):96-107.

18-Rasool SMS, Nateghi L, Lavasani ASH, Estiri SH. Effect of Sourdough Containing *Lactobacillus paracasei* and *fermentum* on Physicochemical Properties and Shelf life of Barbary Bread. Journal of Innovation in Food Science and Technology. 2019;11(2):1-4.

19-Valerio F, Bavaro AR, Di Biase M, Lonigro SL, Logrieco AF, Lavermicocca P. Effect of amaranth and quinoa flours on exopolysaccharide production and protein profile of liquid sourdough fermented by *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. Frontiers in Microbiology. 2020;21(11):967.

Identification and Molecular Detection of Microbial Flora of Fermentation Agent of Different types of Traditional Dough Products of Kerman Province

Mohadeseh Tajalli[1], Mohammad Mehdi Motaghi*[2], Ashraf Kariminik[2]
1-M.S, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
2-Assistant Professor, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
* Corresponding Author: motaghi.mehdi@gmail.com
Received: 5/6/2021, Accepted: 16/9/2021

Abstract
Sourdough microflora generally contains yeast and lactic acid bacteria, and the interaction of microorganisms for its metabolic activity is important. Lactic acid bacteria produce numerous metabolites such as organic acids, enzymes, and exopolysaccharides during sourdough fermentation, which have a positive effect on the structure of the dough and bread's texture and staling. This study aimed to identify and compare the microbial flora of traditional bread dough in different cities of Kerman province by culture and molecular methods. MRS culture medium and Sabouraud Dextrose Agar were used in order to isolate lactic acid bacteria and yeasts respectively. Biochemical and antimicrobial tests were performed. 4 isolates of bacteria and 4 isolates of yeasts were identified by molecular method and comparing the resulting sequences of the sequences in the gene bank, respectively. Bacterial species were *Weissella cibaria*, *Acinetobacter baumannii*, *Pediococcus pentosaceus*, and *Staphylococcus gallinarum*, and yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis*. Based on the results, the microorganisms identified in this study can be suggested to improve the quality of bread and create a better taste and aroma of bread.

Keywords: Sourdough, Microbial Flora, Molecular Identification