جداسازی و شناسایی فنوتیپی باکتری‌های اسید لاکتیک ذاتی ماست تولید شده از شیر گوسفند عشایر منطقه الوند و ارزیابی پتانسیل تولید اسید آنها

نفیسه دعوتی[1*]

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی بهار، دانشگاه بوعلی سینا همدان

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۷/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۹/۲٤)

چکیده

هدف این مطالعه شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک از ماست گوسفندی عشایر الوند و ارزیابی پتانسیل تولید اسید جدایه‌ها می‌باشد. بیست و پنج جدایه به عنوان باکتری اسید لاکتیک از ماست گوسفندی جدا گردید. شمارش باکتری‌های نمونه ماست تحت شرایط بی‌هوازی در $37\ ^0C$ بر روی محیط‌های MRS، M17 و Corn meal agar بر حسب log10 CFU در هر میلی لیتر به ترتیب شامل ۰,۱٤±۵,۸٤، ۰,۲۱±٤,٦۹و ۰,۰٦±۵,۹۵ بود. جهت شناسایی، جدایه‌های میکروبی از نظر رنگ‌آمیزی گرم، فعالیت کاتالاز، فعالیت آرژنین هیدرولاز و تخمیر کربوهیدرات مورد ارزیابی قرار گرفتند. این جدایه‌های میکروبی براساس خواص فنوتیپی و بیوشیمیایی شامل *انتروکوکوس فاسیوم*، *انتروکوکوس دورانس*، *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی*، *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس فرینتوشنسیز*، *لاکتوباسیلوس جانسونی* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* شناسایی شدند.. تولید اسید توسط جدایه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد به ترتیب *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (ΔpH_{3h}=0.65)، *لاکتوباسیلوس فرینتوشنسیز* (ΔpH_{3h}=0.6) و *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی* (ΔpH_{3h}=0.57) بیشترین فعالیت تولید اسید را نسبت به سایر ایزوله‌ها نشان دادند. تولید اسید توسط ایزوله‌ها نشان می‌دهد که این جدایه‌ها می‌توانند pH شیر را به کمتر از ۰,۲±۵ بعد از ٦ ساعت در $30\ ^\circ C$ کاهش دهند و این جدایه‌ها می‌توانند موارد مناسبی برای کاربردهای صنعتی باشند.

کلید واژگان: ماست، شیر گوسفندی، باکتری‌های اسید لاکتیک.

* مسئول مکاتبات: n.davati@basu.ac.ir

۱- مقدمه

امروزه باکتری‌های اسیدلاکتیک اهمیت زیادی در صنایع غذایی، میکروبیولوژی صنعتی و تولید فراورده‌های تخمیری پیدا کرده‌اند. باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان استارتر (آغازگر) نقش مهمی در تبدیل شیر به سایر فراورده‌های لبنی نظیر ماست، دوغ، کره تخمیری و ایجاد عطر و طعم برای پنیر بازی می‌کنند. فعالیت‌های متابولیکی آن‌ها منجر به تولید مواد فرّار موثر در توسعه طعم، آروما و بافت شده و با تولید متابولیت‌های مختلف باعث افزایش زمان ماندگاری فراورده‌های لبنی می‌شوند. سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک اگزو پلی‌ساکاریدهایی تولید می‌نمایند که بافت و ویسکوزیته شیرهای تخمیری را بهبود می‌بخشند. برخی از سویه-های باکتری‌های اسیدلاکتیک مانیتول تولید می‌کنند که اثرات تحریک‌کنندگی بر سلامت انسان دارد [۱]. برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌توانند دارای ویژگی‌های پروبیوتیکی شامل فعالیت ضدتوموری، کاهش کلسترول سرم، کاهش و درمان نقص عدم تحمل لاکتوز، تحریک سیستم ایمنی و تثبیت فلور میکروبی دستگاه گوارش باشند، که بر اهمیت صنعتی آنها افزوده است [۲]. از پتانسیل تکنولوژیکی باکتری‌های اسید لاکتیک در تولید فراورده‌های تخمیری می‌توان به فعالیت پروتئولیتیکی، لیپولیتیکی، اتولیتیکی، دکربوکسیلاسیون، قابلیت اسیدیفیکاسیون و قابلیت تولید پلی ساکارید آن‌ها اشاره کرد [۳]. ایجاد اسیدیته بالا و کاهش سریع pH در اوایل دوره رسیدگی فراورده‌های تخمیری نظیر پنیر و جلوگیری از رشد باکتری‌های خارجی و کوآگولاسیون سریع از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می باشد، توانایی تولید پلی ساکاریدها در بهبود بافت و جلوگیری از آب اندازی محصولات لبنی تخمیری تاثیر دارد [٤]. امروزه جهت تولید فراورده‌های لبنی با کیفیت ثابت از استارترهای وارداتی تولیدی خارج از کشور استفاده می‌شود. با ورود این استارترها به ایران کم کم ما شاهد محو و نابود شدن سویه‌های بومی مولد این محصول باارزش در کشورمان خواهیم بود. جهت شناسایی و حفظ سویه‌های لاکتیکی بومی ایران به عنوان یکی از ذخایر ژنتیکی باارزش در کشور و همچنین با توجه به اهمیت فلور میکروبی هر محصول تخمیری در ایجاد طعم، عطر، اسیدیته، بافت، خواص حسی، خواص ضد باکتریایی، خواص درمانی، خواص پروبیوتیکی و سایر ویژگی‌های یک محصول تخمیری لبنی بایستی، فلور میکروبی دست نخورده محصول بومی آن منطقه مطالعه شود. جامعه عشایری ایران یکی از جوامع بکر می باشد که تکنولوژی نتوانسته در شیوه زندگی سنتی آن‌ها تاثیر بگذارد. از این رو هدف از این مطالعه شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک ماست تولیدی عشایر الوند می‌باشد تا با درک بهتر و کاملتری که از جامعه میکروبی یکی از ماست‌های بومی کشور حاصل می شود بتوان اطلاعات مفیدی جهت مطالعات بعدی در انتخاب یک استارتر کالچر خوب بومی و جداسازی آن جهت معرفی به صنعت ارائه داد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه نمونه و کشت میکروبی(٦،٥و٧):

۱. نمونه برداری از ماست عشایر منطقه الوند تحت شرایط استریل و رقیق سازی در آب پپتونه تا رقت $۱۰^{-۷}$

۲.کشت نمونه رقیق شده در محیط MRS آگار، M17 آگار و KAA آگار

۳. گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٤٨ ساعت

٤. شمارش کلنی‌ها در هر رقت و انتخاب تصادفی کلنی‌های متفاوت از لحاظ رنگ، اندازه، تحدب، تقعر و شکل

٥. انجام کشت خطی جهت خالص‌سازی کلنی‌های متفاوت تا سه مرحله

٦. انجام تست کاتالاز و رنگ آمیزی گرم جهت انتخاب جدایه-های گرم مثبت و کاتالاز منفی به عنوان باکتری‌های اسید لاکتیک و مشاهده میکروسکوپی

۲-۲- شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها در سطح جنس

جدایه‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی به دو دسته کوکسی و میله‌ای طبقه‌بندی شدند.

آزمایش‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص تا سطح جنس برای کلیه جدایه‌ها به صورت زیر صورت گرفت: بررسی رشد در دو دمای ۱۰° C و ٤٥ ° C، در دو غلظت ٦/٥٪ و ۱۸٪ کلرور سدیم، در pH=۹/٦ و pH=٤/٤، بررسی تولید گاز دی اکسید کربن از قند گلوکز در محیط مایع MRS اصلاح شده حاوی لوله دورهام جهت تشخیص هومو و هتروفرمنتاتیو بودن [۹]. به منظور بررسی هیدرولیز آرژنین توسط جدایه‌ها، از محیط ردی براث[1] استفاده شد. باکتری‌هایی که قادر به مصرف آرژنین بودند رنگ محیط را به دلیل تولید اسید لاکتیک ابتدا به زرد و سپس به دلیل تولید آمونیاک به بنفش تبدیل می‌کنند. شرایط گرمخانه‌گذاری ۵ روز در دمای ۳۰° C بود [۱۰].

– کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و هوموفرمنتاتیو قادر به رشد در دو دمای ۱۰ ° C،٤٥ ° C،کلرور سدیم با غلظت ٦,٥٪، pH=۹/٦، pH=٤/٤ و عدم رشد در کلرور سدیم با غلظت ۱۸٪ به عنوان جنس انتروکوکوس در نظر گرفته شدند [۸].

– جدایه‌های کوکسی گرم مثبت، کاتالاز منفی و هوموفرمنتاتیو با آرایش سلولی تتراد که قادر به رشد در کلرور سدیم ۱۸٪ و pH=۹/٦ نبودند به عنوان جنس پدیوکوکوس در نظر گرفته شدند [۸].

– جدایه‌های کوکسی گرم مثبت، کاتالاز منفی و هتروفرمنتاتیو که قادر به رشد در دمای ٤٥ ° C، کلرور سدیم با غلظت ۱۸٪ و pH=۹/٦ نبودند و قابلیت هیدرولیز آرژنین را نداشتند به عنوان جنس لوکونوستوک در نظر گرفته شدند [۸].

– باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت و کاتالاز منفی از نظر رشد در دو دمای ۱۰ ° C و ٤٥ ° C، تولید گاز دی اکسید کربن از قند گلوکز در محیط آبی MRS، رشد در کلرور سدیم با دو غلظت ٦/٥٪، ۱۸٪ و رشد در pH=۹/٦ و pH=٤/٤ به عنوان لاکتوباسیلوس‌های هومو و هتروفرمنتاتیو در نظر گرفته شدند [۸].

۲-۳- شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها در سطح گونه

جهت شناسایی تا سطح گونه جدایه‌های تایید شده در سطح هر جنس از آزمون‌های بیوشیمیایی دیگر (تخمیر کربوهیدرات‌ها و ...) براساس کتاب راهنمای برگی استفاده گردید. جهت تخمیر کربوهیدرات‌ها از محیط پایه شامل عصاره مخمر ۰/۸، تریپتون ۰/۸، پپتون ۱/۲، توئین ۰/۱۸ و برموفنل بلو۰/۰۰٤ بر حسب g/100ml استفاده شد. تمام مواد بالا بایکدیگر مخلوط و باآب دیونایز تا حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد و در ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. سپس قند استریل شده با فیلتر سرسورنگی با قطر ۰/۲ میکرومتر تحت شرایط استریل به آن تا غلظت نهایی قند ۲٪ اضافه گردید. نتایج آزمون جدایه‌ها با خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌ها در کتاب راهنمای برگی مطابقت داده شد. برای تامین شرایط بی‌هوازی ۱ قطره پارافین مایع استریل بر سطح محیط قندی اضافه گردید. کلیه آزمون‌ها در پلیت‌های ۹٦ خانه انجام شد. و تغییر رنگ و ایجاد کدورت بررسی گردید [۱۱].

۲-۳-۱- شناسایی جدایه‌های لاکتوباسیل تا سطح گونه

جدایه‌های تایید شده در سطح جنس لاکتوباسیل، براساس پروفایل تخمیر کربوهیدرات‌ها (آرابینوز، سلوبیوز، گالاکتوز، لاکتوز، مالتوز، مانیتول، مانوز، ملیبیوز، رافینوز، سالیسین، سوربیتول، ساکاروز، تری‌هالوز، گزیلوز، ملی‌زیتوز، ریبوز، اسکولین) و تولید NH_3 از آرژنین تا سطح گونه مورد شناسایی قرار گرفتند [۱۹]. نتایج بعد از۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۰°C ثبت شد [۱۱].

۲-۳-۲- شناسایی جدایه‌های جنس انتروکوکوس تا سطح گونه

جدایه‌های تایید شده در جنس انتروکوکوس براساس پروفایل تخمیر کربوهیدرات‌ها (آرابینوز، سلوبیوز، دولسیتول، فروکتوز، فوکوز، گالاکتوز، گلوکز، گلیسرول، اینوزیتول، لاکتوز، مالتوز، مانیتول، مانوز، ملیبیوز، رافینوز، رامنوز، سوربیتول، ساکاروز، تری‌هالوز، گزیلوز، اینولین، ملی‌زیتوز، ریبوز، سوربوز) و هیدرولیز اسکولین تا سطح گونه مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج بعد از۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۰°C ثبت شد [۱۱].

1. Reddy broth

۲-۳-۳- شناسایی جدایه‌های جنس پدیوکوکوس تا سطح گونه

جدایه‌های تایید شده در جنس پدیوکوکوس، براساس قابلیت رشد در pH=٤/٥، ٧،٨،٩، قابلیت رشد در دماهای ٣٥ °C، ٤٠ °C، ٤٥ °C و ٤٨ °C تولید اسید از آرابینوز، گالاکتوز، لاکتوز، مالتوز، ملیزیتوز، ریبوز وگزیلوز بررسی شدند و بیشترین غلظت کلرورسدیم قادر به تحمل و رشد جهت بررسی تا سطح گونه برای هر جدایه مورد ارزیابی قرار گرفت [١١].

۲-٤- ارزیابی قابلیت تولید اسید

تولید اسید در شیر یکی از ویژگی‌های مهم تکنولوژیکی باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد. برای این منظور از روش‌های پتانسیومتری (اندازه گیری pH)[1] و تیتراسیون[2] جهت ارزیابی تولید اسید استفاده گردید.

۲-٤-۱-روش پتانسیومتریک (اندازه‌گیری pH)

جدایه‌ها به طور اولیه در MRS براث فعال‌سازی گردید و سپس به میزان ١٪ در شیر پس چرخ بازسازی شده به همراه عصاره مخمر ٠/٣٪ و گلوکز ٠/٢٪ کشت داده شدند و در طی گرمخانه‌گذاری در دمای ٣٠ °C تغییرات pH به وسیله pH متر با الکترود شیشه‌ای در طی ٢٤ ساعت اندازه گیری شد. البته قبل از استفاده pH متر با بافر ١ (pH7) و بافر ٢ (pH4) کالیبره شد. pH مناسب بعد از ٦ ساعت کشت در ٣٠ °C باید ٠/٢± ٥ حاصل شود. یک باکتری تولیدکننده سریع اسید باید به مدت ٣ ساعت ΔpH=٠/٤ U حاصل کند. چنین باکتری به عنوان آغازگر جهت تخمیر اولیه پیشنهاد می‌شود و تولید کننده ضعیف اسید به عنوان کمکی بسته به خواص مورد انتظار از تخمیر استفاده می-گردد [١٢].

۲-٤-۲- روش تیتراسیون

به دو میلی‌لیتر از نمونه کشت مرحله قبل، ١ تا ٢ قطره فنل فتالئین ١٪ به عنوان شاخص اضافه گردید. سپس نمونه‌ها با سود N ٠/١ تیتر شدند. زمانی‌که اولین تغییر رنگ جزئی به صورتی ظاهر شد پایان تیتراسیون ثبت شد. هر ١ میلی‌لیتر سود N ٠/١ مصرفی معادل mg ٩/٠٠٨ میلی‌گرم اسید لاکتیک است. نتایج به صورت میلی‌گرم اسید لاکتیک تولیدی در میلی‌لیتر بیان شد [١٣].

۳- نتایج

نتایج شمارش فلور لاکتیکی باکتریایی و مخمری در محیط‌های مورد استفاده در این مطالعه در جدول١ و کلنی‌های رشد یافته در محیط‌های کشت مصرفی در شکل ١ مشاهده می‌شود.

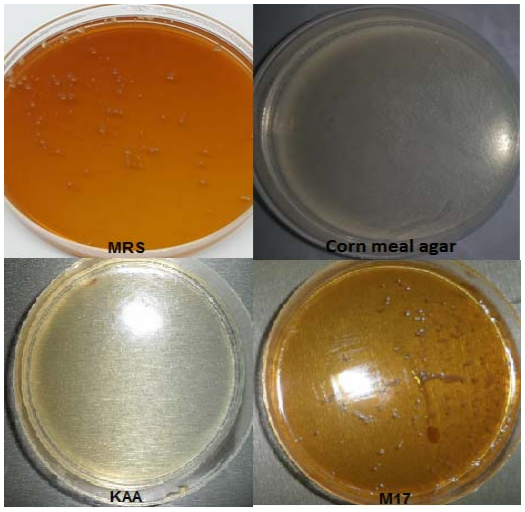

Fig 1 Bacterial and yeast growth on MRS, M17 and Corn Meal Agar media

بر اساس شناسایی اولیه (مشاهده میکروسکوپی و تست کاتالاز) ٢٥ جدایه میکروبی مشکوک به جدایه لاکتیکی شناسایی شد. که در مرحله بعد توسط تست‌های بیوشیمیایی تا سطح جنس و گونه به صورت زیر در جداول ٢، ٣ و ٤ شناسایی گردیدند.

1. Potantiometric (pH measurement)
2.Titrimetric

Table 1 Bacteria and yeasts counts of ewe's yogurt and ewe's milk (Log CFU/ml) in two repetitions

Medium	Bacteria and yeasts counts (Log CFU/ml)
MRS	5.84±0.14
Corn meal agar	5.95±0.06
M17	4.69±0.21

Table 2 Phenotypic characteristics differentiating *Pediococcus* species

Identified isolates	*Pediococcus acidilactici*
Isolate no	9,12,14
Growth at:	
pH 4.5	+
pH 7.0	+
pH 8.0	+
pH 9.0	-
35°C	+
40°C	+
45°C	+
48°C	+
Acid from:	
Arabinose	D
Galactose	+
Lactose	D
Maltose	-
Melibiose	-
Ribose	+
Xylose	+
Max. NaCl conc. For growth	10

+, 90% or more strains positive; −, 90% or more strains negative; d, 11–89% of strains positive

Table 3 Phenotypic characteristics differentiating Enterococcus species

Identified isolates	*E. faecium*	*E. durans*
Isolate no	17	4,6,7
Growth at:		
10 °C	+	+
45 °C	+	+
6.5% NaCl	+	+
Acid from:		
Inulin	-	-
Aesculin	+	+
Melezitose	-	-
Ribose	+	+
Sorbose	-	-
Arabinose	-	-
Cellobiose and Fructose	+	+
Dulcitol	-	-
Fucose	-	-
Galactose and Glucose	+	+
Glycerol	D	-
Inositol	-	-
Lactose and Maltose	+	+
Mannitol	D	-
D-Mannose	+	+
Melibiose and D-Raffinose	D	D
Rhamnose and Sorbitol	D	-
Saccharose	D	D
Trehalose	+	+
Xylose	-	-

+, 90% or more strains positive; −, 90% or more strains negative; d, 11–89% of strains positive

Table 4 Phenotypic characteristics differentiating Lactobacillus species

	Lb. ferintoshensis	*Lb. paraplantarum*	*Lb. johnsonii*	*Lb. delbrueckii*
Isolate no	18,21,22	10,23,25,19	3,15,11,24	1,2,5,8, 16,,20,13
Growth at 15/45(°C)	+/-	+/-	+/+	-/+
Growth at 6.5% NaCl	+	+	+	+
Growth at 18% NaCl	-	-	-	-
Growth at pH=4.4	-	-	+	+
Growth at pH=9.6	-	-	-	-
CO_2 production from glucose	+	-	-	-
Acid from:				
Galactose	+		+	-
Lactose			+	-
Maltose	+		+	d
Mannitol		+	-	-
Mannose	+		+	+
Melibiose and Raffinose	+	+	+	-
Salicin			+	-
Saccharose	+	+	+	+
Trehalose	+		+	d
Arabinose and Aesculin	+	+		
Melisitose and Ribose	+	+		
Sorbitol		+		
Xylose	+	-		
Ammonia production from arginine	+			

+, 90% or more strains positive; −, 90% or more strains negative; d, 11–89% of strains positive.

دراین آنالیز با انتخاب یک نماینده از هر گروه، پتانسیل تولید اسید جدایه‌ها بررسی گردید. براساس جدول ۵ و شکل ۲ بیشترین قابلیت تولید اسید برحسب میلی‌گرم اسید لاکتیک در میلی‌لیتر به ترتیب توسط (۶/۸۸ ±۰/۱۷) *Enterococcus durans*، (۶/۶۰ ±۰/۱۱) *Enterococcus faecium* و (۶/۵۵± ۰/۳۸) *Lactobacillus delbrueckii* حاصل شد.

Table 5 Lactic acid production by Lactic Acid Bacteria at 30 °C in 24 hrs incubation period (in two repetitions)

Isolate	Lactic acid(mg/ml)					
	0h	2h	3h	5h	6h	24h
E. faecium	1.95±0.1	2.15±0.2	2.4±0.12	2.57±0.4	4.14± 0.23	6.6±0.11
E. durans	1.95±0.1	2.15±0.03	2.22±0.47	2.5±0.32	3.6±0.21	6.88± 0.17
Pediococcus acidilactici	1.95±0.1	2.17±0.25	2.50±0.15	3.00±0.76	3.36±0.04	6.5 ±0.43
Lb. paraplantarum	1.95±0.1	2.1±0.41	2.22±0.32	2.65±0.12	2.90±0.16	6.02±0.25
Lb. ferintoshensis	1.95±0.1	2.22±0.62	2.54±0.7	2.83±0.63	3.70±0.24	6.50±0.21
Lb. johnsonii	1.95±0.1	2.15±0.8	2.35±0.20	2.67±0.42	2.95±0.45	6.41±0.2
Lb. delbrueckii	1.95±0.1	2.41±0.45	2.64±0.24	2.95±0.1	4.17±0.22	6.55±0.38

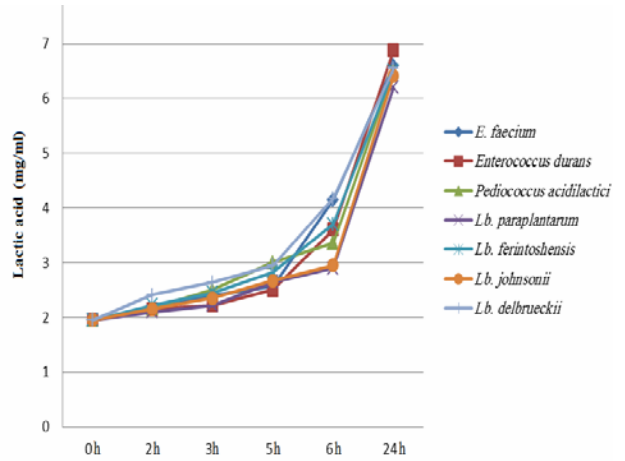

Fig 2 Lactic acid production by Lactic Acid Bacteria at 30 °C in 24 hrs incubation period

همانطور که قبلا اشاره شد، یک جدایه مناسب در زمینه تولید اسید باید بتواند در دمای ۳۰°C در طی ٦ ساعت از کشت pH=۵±۰/۲ حاصل کند و یک باکتری تولید کننده سریع اسید باید به مدت ۳ ساعت از کشت اختلاف pH معادل ۰/٤ واحد (ΔpH=۰/٤ U) در دمای ۳۰°C ایجاد کند. چنین باکتری به عنوان آغازگر جهت تخمیر اولیه پیشنهاد می‌شود و تولید کننده ضعیف اسید به عنوان کمکی بسته به خواص مورد انتظار از تخمیر استفاده می‌شود (۱۲). با توجه به شکل ۳ و جدول٦، نتایج نشان داد که تمام جدایه ها قادرند اختلاف pH معادل ۰,٤ بعد از ۳ ساعت حاصل کنند و به ترتیب *Lb. delbrueckii* (ΔpH_{3h}=0.65)، *Lb. ferintoshensis* (ΔpH_{3h}=0.6) و *Pediococcus acidilactici* (ΔpH_{3h}=0.57) بیشترین قابلیت کاهش pH را نسبت به سایر ایزوله‌ها نشان دادند. همچنین تولید اسید توسط ایزوله‌ها نشان می‌دهد که این جدایه‌ها می‌توانند pH شیر را به کمتر از ۵±۰,۲ بعد از ٦ ساعت در ۳۰ °C کاهش دهند و این جدایه‌ها می‌توانند کاندیدهایی خوبی برای کاربردهای صنعتی باشند.

Table 6 pH changes during bacterial growth at 30 °C in 24 hrs incubation period (in two repetitions)

Isolate	ΔpH		
	3h	6h	24h
E. faecium	0.5±0.01	1.28±0.08	2.04±0.03
E. durans	0.2±0.04	1.15±0.03	2.15±0.02
Lb. paraplantarum	0.42±0.01	1.11±0.07	1.8±0.65
Lb. ferintoshensis	0.6±0.09	1.25±0.03	1.9±0.02
Lb. johnsonii	0.45±0.01	1.05±0.07	1.87±0.15
Lb. delbrueckii	0.65±0.02	1.32±0.02	2±0.07
Pediococcus acidilactici	0.57±0.01	1.14±0.05	1.97±0.13

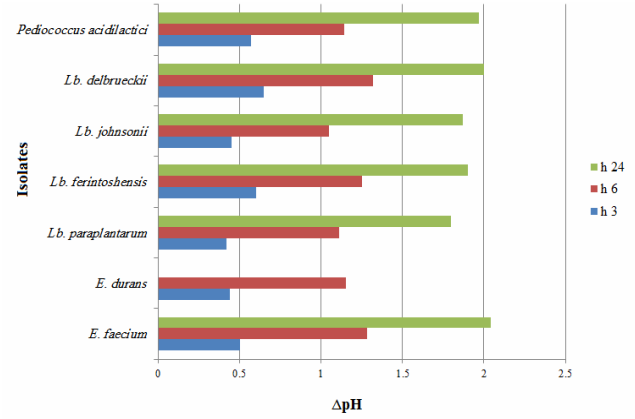

Fig 3 pH changes during bacterial growth at 30 °C in 24 hrs incubation period

٤- بحث

با توجه به شناسایی فنوتیپی فلور لاکتیکی ماست عشایر اثری از گونه *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* که از آغازگرهای اصلی در تولید ماست محسوب می‌شود مشاهده نگردید اما جامعه انتروکوکوسی آن قابل توجه بود که می‌تواند به دلیل بهداشت ضعیف عشایر باشد که به مرور جامعه انتروکوکوسی حاصل از انتقال آلودگی به ماست افزایش یافته و از رشد *استرپتوکوکوس سالواریوس* جلوگیری و آن را ضعیف کرده باشد و در نتیجه در محیط کشت کلنی قابل بازیافت و شناسایی نداشته است و یا اینکه این ماست عشایری توسط سایر گونه های لاکتیکی دیگر که قادر به تولید

اسید می‌باشند ممکن است تولید شود. اما حضور گونه دیگر آغازگر لاکتیکی ماست یعنی *Lactobacillus delbrueckii* در ماست عشایر ثابت شد که چون این شناسایی در سطح گونه انجام شده است احتمالا می‌تواند مربوط به زیرگونه بولگاریکوس باشد. در مطالعه ما براساس شناسایی فنوتیپی گونه منتسب به *Lactobacillus delbrueckii* نسبت به سایر گونه های لاکتیکی قابلیت تولید اسید بالاتری نشان داد. که این یافته در فرایند تولید ماست توسط *lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* در مطالعات متعددی که در گذشته در دنیا انجام شده است ثابت شده و یک امتیاز در امر تولید ماست محسوب می‌شود. در این مطالعه گونه‌های لاکتیکی در تولید اسید متفاوت عمل کردند. سودا نیز در مطالعه خود بر روی گونه‌های جدا شده از پنیر گزارش کرد که ۱۰٪ لاکتوباسیلوس‌ها تولید کننده سریع اسید بوده و ٦٦٪ آن‌ها تولید کننده کند اسید بوده و قادر نیستند ΔpH را به ۰/٤ بعد ۳ ساعت برسانند و عملکرد گونه‌های لاکتوباسیلوس در کاهش pH متفاوت است [١٤]. حاساین نیز نشان داد که سویه‌های لاکتوباسیلوس توانایی متفاوتی در کاهش pH شیر داشته و نمی‌توانند pH را بعد از ٦ ساعت تغییر دهند. اما بعد از ٢٤ ساعت توانستند pH را بین ۰/۸۸ تا ۱/۳۵ واحد تغییر دهند و انتروکوکوس‌ها pH شیر را بعد از ٢٤ ساعت به کمتر از ۵ رسانده و اختلاف pH به میزان ۱/۰۵ تا ۱/۵۱ واحد حاصل کردند [١٥]. اومافووبه در بررسی قابلیت تولید اسید توسط گونه‌های جنس لاکتوباسیلوس گزارش کرد که *Lactobacillus fermentum* بیشترین فعالیت تولید اسید را داشته درحالی‌که *Lactobacillus plantarum* کمترین فعالیت تولید اسید را نشان داد [١٦]. مشابه مطالعه ما انتروکوکوس‌ها در مطالعات دیگر نیز قابلیت تولید اسید خوبی نشان داده‌اند. بولوت در ارزیابی تولید اسید توسط جدایه‌های لاکتیکی نوعی پنیر ترکی نشان داد که *Enterococcus faecium* در کنار گونه *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* که تاکنون قدرت بالایی در تولید اسید در بین سایر اسید لاکتیک باکتری‌ها نشان داده است قادر به کاهش pH به کمتر از ۵/۳ بعد از گذشت ٦ ساعت در دمای ۳۰°C بوده و این دو بیشترین قدرت تولید اسید را نسبت به سایر جدایه‌ها نشان داده‌اند. او نشان داد انتروکوکوس‌ها بعد از ٢٤ ساعت pH را به ٤/٦٧١ ±۰/٢٤ رسانده و ۰/۹۰mg/ml ±۵/۹۵ اسید لاکتیک تولید کردند (۱۳). بنابراین در مقایسه با دیگر مطالعات در زمینه ارزیابی قابلیت تولید اسید توسط فلور لاکتیکی، گونه‌های لاکتیکی جدا شده از ماست گوسفندی عشایر الوند توانایی خوب و مناسبی در تولید اسید نشان داده‌اند. شناسایی ما در این مطالعه تنها به صورت فنوتیپی انجام شد و انتظار می‌رود در صورت انجام شناسایی مولکولی دارای اختلاف در نتایج باشند. زیرا شناسایی مولکولی همواره دقیقتر و کاملتر می‌باشد و نتایج شناسایی فنوتیپی به دلایل مختلفی از دقت پایین‌تری نسبت به شناسایی مولکولی برخودار است. مورائس و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطالعه‌ای جهت مقایسه دقت دو روش فنوتیپی شامل سیستم API50CHL (شامل تخمیر ٤٩ کربوهیدرات در کنار هیدرولیز اسکولین) و روش بیولوژی (شامل یک پلیت منحصر به فرد برای گرم مثبت‌ها و گرم منفی‌ها جهت تخمیر ٩٦ کربوهیدرات) با دو روش مولکولی توالی‌یابی 16S rDNA و واکنش PCR مخصوص گونه[1] برای تعدادی باکتری اسید لاکتیک مشخص انجام دادند. در این مطالعه قابلیت اعتماد به دو روش مولکولی مورد استفاده ۱۰۰٪ بود و تست‌های فنوتیپی قابلیت اعتماد پایین‌تری نشان داده بطوری‌که برای دو روش بیولوژی و روش API50CHL به ترتیب ۹۹/۹ – ٧٤ و ۹۹/۹–۷۸/۲٪ گزارش شد. آن‌ها گزارش کردند برای اکثریت باکتری‌های تست شده هیچ گونه تطابقی بین نتایج فنوتیپی و مولکولی مشاهده نگردید و روش واکنش PCR مخصوص گونه قابلیت اعتماد بیشتری نسبت به روش مولکولی توالی‌یابی S ١٦rDNA در شناسایی در سطح گونه دارد [۱۷]. روش‌های فنوتیپی دارای محدودیت‌ها و معایبی در شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که شامل تکرارپذیری ضعیف، نیازهای تغذیه‌ای مشابهی فلور لاکتیکی، تغییرپذیری باکتری‌ها در طی رشد و تغییر شکل از حالت کروی به میله‌ای کوتاه و قدرت پایین تمایز می‌باشد [۱۷و۱۸]. از طرفی باید در نظر داشت که این مقایسه صورت گرفته برای روش فنوتیپی برمبنای جدول شناسایی راهنمای برگی برخی گونه‌ها در برخی تست‌ها دارای علامت ND (اطلاعاتی قابل دسترس نیست) یا d (۱۱ تا ۸۹ درصد سویه‌ها مثبت هستند) بودند. علامت + یا – نیز برای احتمال ۹۰ درصد تا بیشتر سویه‌ها + یا منفی هستند بیان شده است و این عوامل باعث می‌شود که صحت نتایج شناسایی فنوتیپی دارای قطعیت صد در صد نباشد. باتوجه به نتایج به

1. Species specific PCR reactions

دست آمده ماست گوسفندی عشایر الوند به دلیل حضور *Enterococcus faecium, Enterococcus durans, lactobacillus* و *lactobacillus paraplantarum, delbrueckii* که در مطالعات گذشته به عنوان گونه‌های پروبیوتیک مطرح شده‌اند نیز می‌تواند به عنوان یک محصول پروبیوتیک معرفی گردد.

۵- منابع

[1] Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A., and Zinedine, A. 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological research*. 164(1): 81-91.

[2] Ashmaig, A., Hasan, A., and El Gaali, E. 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese fermented camel's milk (Gariss). *African Journal of Microbiology Research*. 3(8): 451-7.

[3] Crow V.L., Coolbear T., Gopal P.K., Martley F.G., McKay L.L. and Riepe H. 1995. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. International Dairy Journal, 5(8): 855-875.

[4] Shamsia S. M. 2009. Nutritional and therapeutic properties of camel and human milks. International Journal of Genetics and Molecular Biology. 1(2): 052-058.

[5] Abdi, R., Sheikh-Zeinoddin, M., and Soleimanian-Zad, S. 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian Lighvan cheese. Pakistan Journal of Biological Sciences. 9(1): 99-103.

[6] Benson, H.J. Microbiological applications; a laboratory manual in general microbiology. 1967.

[7] Harrigan, W. F. 1998. Laboratory methods in food microbiology: Gulf Professional Publishing.

[8] Salminen, S., Von Wright, A., and Ouwehand, A. 2004. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects: CRC Press; Marcel Dekker. 73-103.

[9] Salminen, S., Von Wright, A., and Ouwehand, A. 2004. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*: CRC Press; Marcel Dekker. 73-103.

[10] Cardinal, M.J., Meghrous, J., Lacroix, C., and Simard, R.E. 1997. Isolation of Lactococcus Lactis Strains Producing Inhibitory Activity against Listeria. *Food Biotechnology*. 11(2): 129-46.

[11] Garrity, G.M., Bell, J.A., and Lilburn, T.G. Taxonomic outline of the prokaryotes. 2004. *Bergey's manual of* systematic bacteriology. Springer, New York, Berlin, Heidelberg. 2nd ed. Vol (3). 484-489, 517, 598-599, 626, 664-671, 673-675, 680-719.

[12] Durlu,Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., and Tunail, N. 2001. Litopoulou Tzanetaki E. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. Journal of *Applied Microbiology*. 91(5): 861-70.

[13] Bulut, Ç. 2003. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese. MSc Thesis, İzmir Institute of Technology, İzmir.

[14] Soda, M. E., Ahmed, N., Omran, N., Osman, G., and Morsi, A. 2003. Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheesemaking. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 15(2).

[15] Hassaïne, O., Zadi-Karam, H., and Karam, N.E. 2007. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (Camelus dromedarius). *African Journal of Biotechnology*. 6(14).

[16] Omafuvbe, B. O., and Enyioha, L. C. 2011. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from selected commercial Nigerian bottled yoghurt. *African Journal of Food Science*. 5(6): 340-8.

[17] Moraes, P. M., Perin, L. M., Silva Júnior, A., and Nero, L. A. 2013. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(1): 109-12.

[18] Mohania D., Nagpal R., Kumar M., Bhardwaj A., Yadav M., and Jain S. 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of digestive Diseases*. 9(4): 190-8.

[19] Lacerda, I. C., Miranda, R. L., Borelli, B. M., Nunes, Á. C., Nardi, R., and Lachance, M. A. 2005. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. *International journal of food microbiology*. 105(2): 213-9.

Isolation and Identification of Indigenous Lactic Acid Bacteria from Traditional Yogurt Produced from Ewe's Milk from Alvand Nomads Region and Evaluation of Their Acidifying Potential

Davati, N. [1*]

1. Assistant professor, Department of Food Science and Technology. Bu-Ali Sina University . Hamadan, Iran.

(Received: 2016/11/11 Accepted:2016/12/14)

The aim of this study is identification of lactic acid bacteria from ewe's yogurt from alvand nomads and evaluation of acidifying potential of isolates. A total of 25 bacteria as lactic acid bacteria were isolated from ewe's yogurt. The log10 CFU of bacterial count per ml of yogurt on MRS, M17 and Corn meal agar under anaerobic condition at 37 ^{0}C included 5.84 ±0.14, 4.69± 0.21 and 5.95± 0.06 respectively. To identify the strains isolated, they were tested by examining their cell morphologies, gram-staining, catalase activity, arginine hydrolase activity and carbohydrate fermentation. Isolates of yogurt Produced from Ewe's Milk were identified on the basis of biochemical and phenotypic characteristics as *Enterococcus faecium, Enterococcus durans, Pediococcus acidilactici, lactobacillus paraplantarum, lactobacillus ferintoshensis, lactobacillus johnsonii and lactobacillus delbrueckii.* Acidification activity of isolates was assessed. *lactobacillus delbrueckii (*ΔpH_{3h}=0.65), *lactobacillus ferintoshensis (*ΔpH_{3h}=0.6) and *Pediococcus acidilactici (*ΔpH_{3h}=0.57) showed more acidifying activity than other isolates, respectively. Acid production profiles of isolates indicated that these isolates could lower the pH of milk below 5±0.2 in 6 h incubation at 30 °C and these isolates were therefore the best starter candidates for industrial applications.

Keywords: Yogurt, Ewe's milk, Lactic acid bacteria.

* Corresponding Author E-Mail Address: n.davati@basu.ac.ir