بسم الله الرحمن الرحيم
نور السموات والارض

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد علوم مواد غذایی

جدا سازی و تشخیص گونه های باکتری اسید لاکتیک بومی از فرآورده های سنتی لبنی شهرستان شاهرود

گرد آورنده: زهره بیگم طباطبایی

استاد راهنما:

دکتر حمیدرضا صمدلویی

استاد مشاور:

دکتر شاهرخ قرنجیک

خرداد ۱۳۹۸

شماره: ۱۴۵/ر
تاریخ: ۱۳۹۸/۴/۲۳

باسمه‌تعالی

دانشگاه صنعتی شاهرود
مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای زهره بیگم طباطبایی با شماره دانشجویی ۹۴۱۱۵۳۴ رشته مهندسی کشاورزی گرایش علوم و صنایع غذایی تحت عنوان جدا سازی و تشخیص گونه های باکتری اسید لاکتیک بومی از فرآورده های سنتی لبنی شهرستان شاهرود که در تاریخ ۹۸/۰۳/۲۷ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با درجه: عالی خوب .....) ☑ **مردود** ☐

نوع تحقیق: **نظری** ☐ **عملی** ☑

عضو هیأت داوران	نام ونام خانوادگی	مرتبهٔ علمی	امضاء
۱ـ استادراهنمای اول	دکتر حمیدرضا صمدلویی	استادیار	
۲- استادراهنمای دوم			
۳- استاد مشاور	دکتر شاهرخ قرنجیک	استادیار	
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر احمد رجائی	استادیار	
۵- استاد ممتحن اول	دکتر کامبیز جهان بین	دانشیار	
۶ـ استاد ممتحن دوم	دکتر پرویز حیدری	استادیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: محمدرضا عامریان

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (دو نیمسال مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

تقدیم به:

مهربانترین همراهان زندگیم

پدر بزرگوار، مادر دلسوز و همسر عزیزم

که حضورشان همیشه مایه آرامش تن و گرمابخش روح من بوده است.

سپاس نامه

خداوند سبحان را سپاس می گویم که این توفیق را به من عطا فرمود تا وجود خویش را به زینت علم بیارایم، باشد که شاکر باشم، بیاموزم، برگزینم و عمل نمایم.

سالهایی که در این دانشگاه به آموختن گذرانده ام برایم بسیار گرانبهاست و پرتو دانش نظری و تجربی فراگیر اساتید گرانقدر، همواره راهنما و چراغ راهم بوده است. از اساتید فرزانه آقای دکتر حمید رضا صمد لویی و آقای دکتر شاهرخ قربیجک که راهنمایی این پایان نامه را پذیرفتند و دشواری های راه پژوهش را بر من هموار کردند صمیمانه قدردانی می نمایم.

بجاست از اساتید ارجمند آقایان دکتر جهان بین و دکتر رجائی که افتخار شاگردی ایشان را داشته ام یادی کنم.

سلامت و پایداری آن بزرگواران را در عرصه علم و دانش این مرز و بوم از خداوند خواستارم.

زهره طباطبایی

تعهد نامه

اینجانب **زهره بیگم طباطبایی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی گرایش **علوم و صنایع غذایی** دانشکده **کشاورزی** دانشگاه **صنعتی شاهرود** نویسنده پایان نامه جدا سازی و تشخیص گونه های باکتری های اسید لاکتیک بومی از فرآورده های سنتی لبنی شهرستان شاهرود تحت راهنمایی آقای دکتر **حمیدرضا صمدلویی** متعهد می شوم.

تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.

در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.

مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.

کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام "دانشگاه صنعتی شاهرود" و یا"Shahrood University Of Technology" به چاپ خواهد رسید.

حقوق معنوی تمام افرادی که در بدست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیر گذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.

در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.

در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ: ۹۸/۰۲/۲۰

امضای دانشجو : زهره بیگم طباطبایی

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.

استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

در این تحقیق، نمونه‌های محصولات سنتی شهرستان شاهرود نظیر پنیر، دوغ، ماست، کشک خشک، کره از مراتع شهرهای واقع در این شهرستان شامل کالپوش،کلاته خیج، مجن تهیه، با رعایت شرایط استاندارد به آزمایشگاه انتقال یافت. ابتدا کلنی‌های باکتری های اسید لاکتیک با استفاده از محیط‌های اختصاصی، مشاهدات میکروسکوپی و ماکروسکوپی و تست‌های افتراقی جدا شدند، سپسمنطقه ریبوزومیگونه های ایزوله شده با استفاده از دستگاه PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 16S rRNA تکثیر شد. نتایج نشان داد تنوع ارزشمندی از باکتری های اسید لاکتیک در دوغ و ماست سنتی شهرستان شامل گونه های با شباهت بالا به گونه *Lactobacillus Delbruckii* , *SB7,Lactobacillus Delbruckii-bulgaricus TW49-1* در دوغ کلاته خیج، *Lactococcuslactis-NCIM 2114*، *Lactobacillus Paracasei Lb37*در دوغ کالپوش و*LactobacillusMocosae-BJ18-2*، *Lactobacillus Delbruckii SkB1083*در ماست کلاته خیجوجود دارد. پس از شناسایی گونه، بررسی وجود ε - پلی ال لایزین بررسی شد که گونه لاکتوباسیلوس دلبروکلی این متابولیت را به صورت قابل توجهی تولید کرد و در گام بعدی تغییر میزان منابع کربنی (گلوکز) و منابع پروتئینی (پودر سویا) در تولید ε - پلی ال لایزین و بهینه سازی به روش آماری سطح پاسخ صورت گرفت و میزان این دو ترکیب به منظور افزایش تولید پلی ال لایزین به روش آماری RSM بهینه شد. پس از ۳ روز تخمیر در شرایط بهینه میزان گاما پلی ال لیزین ۲۰۵ پی پی ام بدست آمد که با نتایج پیش بینی شده از فرمول که میزان ۱۹۹/۲۲ پی پی ام بود نزدیکی قابل توجهی داشت. مدل سطح پاسخ نشان داد که هرچه میزان پودر سویا و گلوکز کاهش یابد، میزان ε - پلی ال لایزین افزایش می یابد. بیشترین مقدار ε - پلی ال لایزین در غلظت گلوکز(۲۶/۰۳ gr/l) و پودر سویا (۶/۲۸gr/l) بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: باکتری های اسید لاکتیک، متابولیت ε- پلی ال لایزین، NCBI- روش سطح پاسخ

فهرست مطالب

فصل اول کلیات تحقیق ۱

۱-۱- باکتری های اسید لاکتیک مهم در فرآورده های لبنی ۷

۱-۱-۱- راسته لاکتوباکتریاسه ۱۱

۱-۱-۱-۱- جنس لاکتوباسیلوس ۱۱

۱-۱-۱-۱-۱-طبقه‌بندی سنتی لاکتوباسیلوس‌ها ۱۳

۱-۱-۱-۱-۲- طبقه‌بندی مدرن لاکتوباسیلوس ها ۱۶

۱-۱-۱-۱-۳- سازگار نمودن طبقه‌بندی سنتی و مدرن لاکتوباسیلوس ها ۱۷

۱-۱-۱-۲- جنس پدیوکوکوس ۲۰

۱-۱-۲- خانواده استرپتوکوکاسه ۲۱

۱-۱-۲-۱- جنس استرپتوکوکوس ۲۱

۱-۱-۲-۱-۱- استرپتوکوک های پیوژن ۲۱

۱-۱-۲-۱-۲- استرپتوکوک های ویریدانس: ۲۲

۱-۱-۲-۱-۳- انتروکوک ها ۲۲

۱-۱-۲-۱-۴- استرپتوکوکوس لاکتیس ۲۳

۱-۱-۲-۲- لاکتوکوکسی ها: ۲۳

۱-۱-۳- لویکونوستک ها: ۲۴

۱-۲- تاریخچه شناسایی پروبیوتیک ها ۲۵

۱-۲-۱- مهمترین جنس‌ها و گونه‌های پروبیوتیک ۲۷

۱-۲-۱-۱- جنس لاکتوباسیلوس ۲۷

۱-۲-۱-۲- جنس بیفیدوباکتریوم ۳۰

۱-۲-۲- خواص سلامت بخش پروبیوتیک‌ها ۳۰

۱-۲-۳- معرفی برخی متابولیتهای ارزشمند پروبیوتیک ها ۳۲

۱-۳- آشنایی با فرآورده های لبنی ۳۷

۱-۳-۱- ماست: ۳۸

۱-۳-۱-۱- تعریف و تاریخچه ۳۸

۱-۳-۱-۲- انواع ماست ۴۰

۱-۳-۲- پنیر: ۴۱

۱-۳-۳- کره ۴۳

۱-۳-۴- دوغ ۴۴
۱-۳-۴-۱- طبقه بندی دوغ: ۴۵
۱-۳-۵- کشک ۴۶
۱-۴- آشنایی با واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) وتوالی یابی برای شناسایی و جداسازی باکتری ها ۴۷
۱-۴-۱- اصول واکنش PCR ۴۸
۱-۴-۲- مزایا و معایب تکنیک PCR ۴۹
فصل دوم بررسی منابع ۵۱
۲-۱- جداسازی و شناسایی و زنده مانی باکتری های اسید لاکتیک و پروبیوتیک ها ۵۲
۲-۲- بکار گیری روش های تعیین توالی نوکلئوتیدی در بخش 16S rRNA برای شناسایی ۵۸
۲-۳ جست و جو و شناسایی متابولیت های مفید باکتری های اسید لاکتیک ۶۱
فصل سوم مواد و روش ها ۶۳
۳-۱- مواد شیمیایی، محیط های کشت و محلول های مورد نیاز ۶۵
۳-۱-۱- مواد و محیط های مورد نیاز در مرحله ایزوله سازی سوش و شناسایی میکروسکوپی ۶۵
۳-۱-۲- مواد، ابزار و محیط های مورد نیاز در مرحله آزمایشات بیوشیمیایی ۶۵
۳-۱-۳- محلول های مورد استفاده در استخراج DNA، PCR و الکترفورز ۶۶
۳-۱-۴-مواد مورد استفاده در شناسایی ε- پلی ال لایزین ۶۶
۳-۲- دستگاه ها و وسایل مورد استفاده در آزمایشات: ۶۷
۳-۳- روش انجام آزمایش: ۶۸
۳-۳-۱- جمع آوری نمونه ها ۶۸
۳-۳-۲- جداسازی میکروارگانیسم از فرآورده های لبنی سنتی ۶۸
۳-۳-۳- رنگ آمیزی افتراقی گرم ۶۹
۳-۳-۴- آزمون کاتالاز ۷۰
۳-۳-۵- آزمایشات بیوشیمیایی ۷۰
۳-۳-۶- آزمایشات مولکولی ۷۲
۳-۳-۶-۱- استخراج DNA با استفاده از کیت ۷۲
۳-۳-۶-۲- بررسی کیفیت DNA استخراجی توسط دستگاه نانو دراپ ۷۴
۳-۳-۶-۳- انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۷۵
۳-۳-۶-۳-۱- نمونه DNA الگو ۷۶
۳-۳-۶-۳-۲- آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت ۷۶
۳-۳-۶-۳-۳- سیستم بافری ۷۶

۳-۳-۶-۳-۴- کاتیونهای دو ظرفیتی ۷۶
۳-۳-۶-۳-۵- پرایمرها (آغازگرها): ۷۶
۳-۳-۶-۳-۶- داکسی نوکلئوتید تری فسفات ۷۷
۳-۳-۶-۳-۷- اجزای واکنش PCR : ۷۹
۳-۳-۶-۴- تفکیک قطعات تکثیر یافته پس از PCR ۸۱
۳-۳-۶-۴-۳- لودینگ بافر 6X: ۸۳
۳-۳-۷- رنگ آمیزی و عکس برداری از ژل آگارز: ۸۳
۳-۳-۸- ارسال جهت توالی یابی ۸۵
۳-۳-۹- نرم افزارهای بیو انفورماتیکی ۸۵
۳-۳-۱۰- تشخیص متابولیت ε- پلی ال لایزین و بررسی اثر ترکیبات محیط کشت روی میزان آن ۸۵
۳-۳-۱۰-۱- تشخیص وجود ε- پلی ال لایزین (مرحله مقدماتی): ۸۵
۳-۳-۱۰-۲- تشخیص وجود ε- پلی ال لایزین (مرحله تکمیلی) و بررسی اثر ترکیبات محیط کشت: ۸۶
۳-۳-۱۰-۳- طراحی ترکیبی توسط نرم افزار RSM ۸۷
فصل چهارم نتایج و بحث ۸۹
۴-۱- آماده سازی نمونه ها: ۹۰
۴-۲- باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از نمونه دوغ کلاته خیج ۹۰
۴-۲-۱- کد dd01 ..... ۹۱
۴-۲-۲- کدهای dd02 و dd03 ..... ۹۶
۴-۳- باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از نمونه دوغ کالپوش ۱۰۰
۴-۳-۱- کد dk01 ..... ۱۰۰
۴-۳-۲- نمونه با کد dk02 ..... ۱۰۳
۴-۳-۳- نمونه با کد dk03 ..... ۱۰۶
۴-۴- باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از نمونه ماست کلاته خیج ۱۰۹
۴-۴-۱- نمونه با کد MB02 ..... ۱۱۰
۴-۴-۲- نمونه با کد MB03 ..... ۱۱۳
۴-۵- جست و جو و شناسایی ε - پلی ال لایزین ۱۱۶
۴-۵-۱ بهینه سازی به روش آماری سطح پاسخ ۱۱۷
۴-۵-۲- نتایج میزان ε - پلی ال لایزین ۱۲۰
۴-۵-۳- مقادیر بهینه پیش بینی شده توسط مدل درجه دوم برای متغیرها ۱۲۱
۴-۵-۴- ارزیابی مدل رگرسیون تولید ε - پلی ال لایزین ۱۲۲

فصل پنجم منابع ۱۲۵
۵-۱- منابع ۱۲۵

فهرست اشکال:

شکل۱-۱: مسیر های متابولیسمی حاصله از گلوکز توسط باکتری های اسید لاکتیک (Garvie, 1984) ۳

شکل ۳-۱: کشت Pour Plate نمونه ها روی MRS آگار ۶۸

شکل ۳-۲ : کشت خطی نمونه روی سطح MRS آگار ۷۰

شکل ۳-۳: تهیه محلول قندی استوک و استریل با عبور از فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرون ۷۲

شکل۳-۴: تصویر حاصل از دستگاه نانو دراپ ۷۵

شکل ۳-۵: نمایی از سیکل PCR در مراحل مختلف ۸۰

شکل ۳-۶ مواد و دستگاههای بکار رفته در ژل الکتروفورز ۸۴

شکل ۳-۷- تلقیح نمونه به محیط کشت با درصدهای متفاوت گلوکز و پودر سویا ۸۷

شکل ۴-۱- کلنی های رشد یافته در پلیت با اشکال مورفولوژیکی متفاوت ۹۰

شکل ۴-۲: تصویر رنگ آمیزی گرم کلنیdd01 استخراج شده از دوغ کلاته خیج ۹۱

شکل۴-۳: مشاهده ژل نمونه های DNA تکثیر شده پس از PCR ۹۴

شکل۴-۴- درختچه فیلوژنتیکی گونه اسید لاکتیک باکتری جدا شده با ۱۲ گونه مشابه بر اساس آنالیز Nearest neighbor interchange منطقه 16s ریبوزومی (The bootstrap level : 1000 pseudo-replications) ۹۵

شکل۴-۵ : تصویر رنگ آمیزی گرم کلنی هایdd03,dd02 استخراج شده از دوغ کلاته خیج ۹۷

شکل۴-۶ : درختچه فیلوژنتیکی گونه اسید لاکتیک باکتری جدا شده با ۱۳ گونه مشابه بر اساس انالیز Nearest neighbor interchange منطقه 16s ریبوزومی (The bootstrap level : 1000 pseudo-replications) ۱۰۰

شکل ۴-۷: تصویر رنگ آمیزی گرم کلنیdk01 استخراج شده از دوغ کالپوش ۱۰۱

شکل۴-۸: درختچه فیلوژنتیکی گونه اسید لاکتیک باکتری جدا شده با ۱۲ گونه مشابه بر اساس انالیز Nearest neighbor interchange منطقه 16s ریبوزومی (The bootstrap level : 1000 pseudo-replications) ۱۰۳

شکل ۴-۹: تصویر رنگ آمیزی گرم کلنیdk02 استخراج شده از دوغ کالپوش ۱۰۴

شکل۴-۱۰ : درختچه فیلوژنتیکی گونه اسید لاکتیک باکتری جدا شده با ۱۲ گونه مشابه بر اساس انالیز Nearest neighbor interchange منطقه 16s ریبوزومی (The bootstrap level : 1000 pseudo-replications) ۱۰۶

شکل ۴-۱۱: تصویر رنگ آمیزی گرم کلنیdk03 استخراج شده از دوغ کالپوش ۱۰۷

شکل۴-۱۲ : درختچه فیلوژنتیکی گونه اسید لاکتیک باکتری جدا شده با ۱۲ گونه مشابه بر اساس انالیز Nearest neighbor interchange منطقه 16s ریبوزومی (The bootstrap level : 1000 pseudo-replications) ۱۰۹

شکل ۴-۱۳: تصویر رنگ آمیزی گرم کلنیMB02 استخراج شده از ماست کلاته خیج ۱۱۰

شکل۴-۱۴: درختچه فیلوژنتیکی گونه اسید لاکتیک باکتری جدا شده با ۱۱ گونه مشابه بر اساس آنالیز Nearest neighbor interchange منطقه 16s ریبوزومی (The bootstrap level : 1000 pseudo-replications) ۱۱۳

شکل ۴-۱۵: تصویر رنگ آمیزی گرم کلنیMB03 استخراج شده از ماست کلاته خیج ۱۱۴

شکل۴- ۱۶: درختچه فیلوژنتیکی گونه اسید لاکتیک باکتری جدا شده با ۱۲ گونه مشابه بر اساس انالیز Nearest neighbor interchange منطقه 16s ریبوزومی (The bootstrap level : 1000 pseudo-replications) ۱۱۶

نمودار ۴-۱۷: منحنی RSM برای تولید ε - پلی ال لایزین (پی پی ام) به وسیله ی گونه باکتری با متغیرهای گلوکز (A) و پودر سویا (B) ۱۲۱

فهرست جداول:

جدول ۱-۱- نمونه هایی از استارتر های بکار رفته برای انواع خاص پنیر (Marshal and Law, 1984) ۸

جدول ۱-۲- لیست مهمترین لاکتوباسیلوس‌های مربوط به انسان و حیوانات ۲۹

جدول ۳-۱ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن 16S rRNA ۷۷

جدول۳-۲: حداقل تجهیزات مورد نیاز آزمایشگاهی برای انجام واکنش PCR ۷۸

جدول ۳-۳: اجزاء مخلوط واکنش برای PCR با حجم کلی ۲۰ میکرولیتر ۷۹

جدول۳-٤: سیکل حرارتی واکنش PCR باDNA ژنومیک ۸۰

جدول۳-۵: راهنمای عکس لوازم و دستگاههای بکار رفته در الکتروفورز ۸۳

جدول ۳-۶: نسبت های پیشنهادی توسط نرم افزار RSM ۸۷

جدول ۴-۱: میزان واقعی و کد شده متغیرهای غیر وابسته در روش آماری RSM ۱۱۸

جدول ۴-۲- پارامترهای ANOVA برای مدل Ɛ - پلی ال لایزین (A گلوکز و B پودر سویا) ۱۱۸

جدول ۴-۳: طراحی آزمایش ها و نتایج از دو متغیر اعمال شده بر روی پاسخ در روش RSM ۱۱۹

فصل اول

کلیات تحقیق

مقدمه و هدف

شناسایی، جداسازی و غربال میکروارگانیسمها از منابع طبیعی، وسیله ای مؤثر برای دست یابی به گونه هایی از باکتری هاست که از لحاظ ژنتیکی حائز اهمیت هستند. طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها در شرایط مختلف در اطراف ما در حال زندگی هستند. بسیاری از این میکروارگانیسم ها نقش مؤثری در بهبود شرایط زندگی سایر موجودات از جمله انسان دارند. برای مثال، باکتری های اسید لاکتیک پروبیوتیک های زنده ای هستند که با اصلاح تعادل میکروبی داخل دستگاه گوارش به خصوص محیط روده در موجودات زنده و به دنبال آن تغییر متابولیسم میکروبی، باعث افزایش سیستم ایمنی بدن، جلوگیری از عفونت های باکتریایی و جلوگیری و درمان اسهال در انسان می شوند(Reid,1999).

باکتریهای اسیدلاکتیک عموماً، باکتریهای گرم مثبت، بی‌حرکت، غیراسپورزا، کاتالاز منفی و سیتوکروم اکسیداز منفی هستند که قادر به ذوب ژلاتین، احیا نیترات و تولید اندول، قادر به تحمل شرایط اسیدی و بی هوازی اختیاری می‌باشند.

همه باکتریهایاسیدلاکتیک متابولیسمی تخمیری داشت و به شدت ساکارولیتیک هستند که محصول نهایی عمده حاصل از مصرف کربوهیدرات ها، اسیدلاکتیک می‌باشد. باکتری های اسید لاکتیک را می توان از منابع وسیعی جدا کرد. انواع دانه ها، گیاهان سبز، سبزیجات تخمیری، محصولات لبنی، انواع ماهی و خاک از جمله این منابع هستند (Katiresan&Thiruneelakandan.,2003).

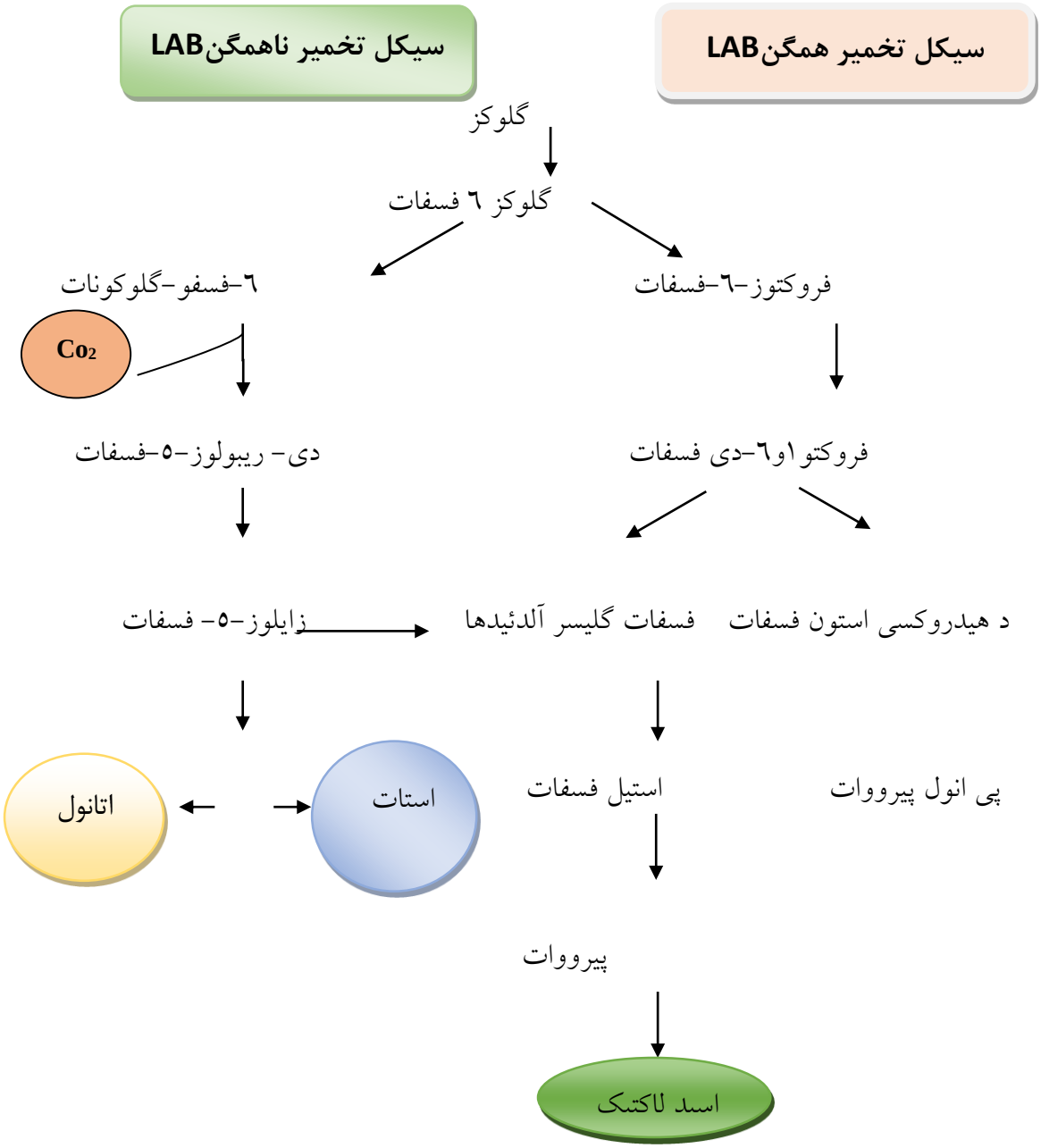
باکتریهای اسید لاکتیک گروه بزرگ و هتروژنی را تشکیل می دهند که شامل جنس هایی مثل Lactobacillus وEnterococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus,Streptococcus هستند (Lahtinen et al., 2011).

این باکتری ها به عنوان آغازگر در تولید انواع محصولات لبنی تخمیری و سایر انواع محصولات تخمیری مورد استفاده قرار می گیرد (Cesselinet al., 2011).

براساس متابولیسم کربوهیدراتها، باکتری های اسید لاکتیک به دوگروه تقسیم می شوند:

۱) باکتری های اسید لاکتیک تخمیر همگن[1] که اساساً اسید لاکتیک تولید می کنند.

۲) باکتری های اسید لاکتیک تخمیر ناهمگن[2] که علاوه بر اسید لاکتیک، Co_2، اتانول و یا اسید استیک نیز تولید می کنند (Klaenhammer et al., 2002)(شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱: مسیر های متابولیسمی حاصله از گلوکز توسط باکتری های اسید لاکتیک (Garvie, 1984)

[1]Homofermentative
[2]Hetrofermentative

در این تحقیق باکتری‌های اسید لاکتیک ازفرآورده های لبنی بومی شهرستان شاهرود جداسازی و تشخیص داده شده‌اند. تشخیص باکتری‌های اسید لاکتیک به دلایل زیر مهم است:

۱) اثرات مفیدی روی بدن دارند وبرخی از آن‌ها نقش پروبیوتیکی ایفا می‌کنند.

۲) از لحاظ اقتصادی اهمیت دارند.

۳) می‌توان از آن‌ها برای نگهداری مواد غذایی استفاده کرد.

۱- تشخیص باکتری های اسید لاکتیک

ابتدا تشخیص بر اساس الگوی تخمیر کربوهیدرات بود ولی به دلیل این که این الگو برای زیرگونه‌ها یکسان است، این نوع تشخیص قابل اعتماد نیست. در نتیجه دانشمندان با آنالیز توالی ژن 16S rRNA این باکتری‌ها را شناسایی می‌کنند.

در این تحقیق گونه‌های اسید لاکتیک تشخیص داده شد. که مراحل کار بدین صورت است:

جداسازی از محیط و تکثیر توده زیستی، استخراج DNA با کیت‌های مخصوص تکثیر ژن 16S rRNA با PCR توسط پرایمرهای عمومی، خالص سازی ژن از روی ژل الکتروفورز و توالی یابی ژن با روشfluorescently labeled و تشخیص آن با بررسی سایت NCBI و رسم درختچه ی فیلوژنی و پیدا کردن گونه‌های خواهری آن که با دو نرم افزار Codoncode Aligner و MEGA5 صورت گرفت.

۲- ضرورت انجام تحقیق

از آنجاییکه در محصولات تخمیری لبنی، ریزسازواره‌ها نقش مهم و حیاتی در تولید و ایجاد طعم و آروما در آن را دارند و با توجه به این که که تمام گونه‌های استفاده شده در فرآوردههای لبنی صنعتی گونه‌های وارداتی می‌باشد، این پدیده با در نظر گرفتن خصومت کشورهایی که این گونه‌های میکروبی را به کشور می‌فروشند سالیان دراز است که به اثبات رسیده همواره خطر استفاده از این گونه‌های ناشناخته سلامت عمومی را می‌تواند تهدید کرده از این رو توجه به گونه‌های بومی این نوع ریزسازواره‌ها در ایران و تشخیص این گونه‌ها به منظور جایگزین مناسب گونه‌های وارداتی اهمیت این

تحقیق را دو چندان می‌کند. در این راستا گونه‌های میکروبی اسید لاکتیک باکتری از فرآوردههای بومی شهرستان جداسازی گردید و تکثیر یافت و پس از استخراج DNA توالی ژن‌های ریبوزومی با توجه به آغازگرهای عمومی تعیین توالی شده و با استفاده از سایت NCBI، این گونه‌های میکروبی تشخیص داده می‌شود.

۳- اهداف تحقیق

- تعیین ژنوتایپ گونه‌های باکتری های اسیدلاکتیک از طریق توالی یابی و تأیید با روشهای بیوشیمیایی و مورفولوژیکی در محصولات سنتی.
- بررسی متابولیت ارزشمند ε- پلی ال لایزین.

از آنجا که تاکنون تحقیق دامنه‌داری در مورد گونه‌های سنتی باکتری های اسیدلاکتیک فرآورده های لبنی شهرستان و حومه آن صورت نگرفته این پژوهش زمینه‌ای را برای تعیین ژنو تایپ در گونه های باکتری های اسیدلاکتیک محصولات سنتی و بررسی متابولیت های تولید شده توسط این گونه هادر شهرستان را فراهم می سازد.

تعریف واژه‌های کلیدی

باکتری‌های اسیدلاکتیک: گونه‌هایی از باکتری‌ها که توانایی مصرف قند و تولید اسیدلاکتیک را دارند.

متابولیت ε- پلی ال لایزین:ε- پلی ال لایزین (ε-PL) یک هموپلیمر اساسی است که فعالیت ضد میکروبی قوی بر علیه اکثریت باکتری های گرم مثبت و گرم منفی، قارچ ها و همچنین برخی از انواع ویروس ها دارد.

NCBI: پایگاه اطلاعاتی ژنومی است که حاوی اکثر اطلاعات بدست آمده در زمینه ژنتیک موجودات است.

روش سطح پاسخ: این روش، یک روش آماری برای طراحی آزمایشات، ارزیابی تأثیر فاکتورهای مختلف و یافتن شرایط اپتیمم برای بازده مطلوب می باشد و به طور وسیعی برای بهینه سازی شرایط کشت و پارامترهای دیگر استفاده می شود.

در این فصل با توجه به این که موضوع تحقیق و کار روی فرآورده های لبنی بوده است دسته بندی مطالب در چهار بخش صورت گرفته است:

الف) در بخش اول با توجه به اهمیتی که برخی جنس های باکتری های اسید لاکتیک در تولید فرآورده های لبنی دارند به اختصار توضیحاتی در خصوص سه راسته لاکتوباکتریاسه، استرپتوکوکاسه و لویکونوستوکاسه آورده شده است.

ب) با توجه به این که در بخش نهایی تحقیق، تولید یکی از متابولیت های باکتری های اسید لاکتیک در نمونه ها توسط گونه های ایزوله شده مورد بررسی قرار گرفت (ε - پلی ال لایزین) در بخش دوم فصل اول به توضیحاتی در خصوص پروبیوتیک ها و متابولیت های آنها نظیر اگزو پلی ساکارید ها، گاما آمینو بوتیریک اسید و در نهایت ε - پلی ال لایزین پرداختیم.

ج) با توجه به این که برای کشت و ایزوله سازی باکتری از ماست، دوغ، پنیر، کره یا روغن و کشک خشک بومی استفاده شد در بخش سوم به توضیحاتی مختصر در خصوص پیشینه و خواص این ترکیبات اشاره می شود.

د) نظر به این که روش های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی به تنهایی برای تشخیص گونه ها کافی نیست و روش های ژنتیکی تأثیر بسزایی در شناسایی گونه ها داراست و در این روش ها نیز مسئله اصلی در بررسی یک ژن خاص، مشکل هدف گیری آن در یک ژنوم پیچیده است که ممکن است بیش از هزاران ژن داشته باشد، واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)[1]یک روش قدرتمند برای تکثیر قطعه ویژه و انتخابی از این ژنوم می باشد (جامی الاحمدی و افضل جوان، ۱۳۹۶). لذا با توجه به اهمیت آن در بخش انتهایی به اختصار به کلیاتی در خصوص PCR و توالی یابی پرداختیم.

[1]Polymerase Chain Reaction

۱-۱- باکتری های اسید لاکتیک مهم در فرآورده های لبنی

باکتری‌های لاکتیکی مورد استفاده در تخمیر فرآورده های لبنی براساس دمای بهینه رشدشان به ۲ گروه تقسیم می‌شوند. دمای بهینه رشد باکتری‌های لاکتیکی مزوفیل بین ۳۰°C ـ ۲۰ است و ترموفیل‌ها دمای بهینه رشدی بین ۴۵°C ـ ۳۰ دارند (Wouters et al., 2002).

در صنعت لبنیات، استارتر کالچرها به سه گروه تقسیم می شوند:

۱) استارتر کالچرهای مزوفیل ۲) استارتر کالچرهای ترموفیل ۳) استارتر کالچرهای صنعتی

هر یک از این گروه ها می تواند به گروه های دیگری تقسیم شود. کالچرهای تعریف نشده که در آن ها تعدادی سوش های ناشناخته است (Axelsson, 1998).

۱- باکتری‌های اسید لاکتیک مزوفیل

این باکتری ها دمای اپتیمم رشدشان ۳۰°C است. سوش های این گروه متعلق به دوگونه لاکتوکوکوس و لویکونستوک است. لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه لاکتیس و لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه کرموریس که تولید کننده اسید هستند و لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه های لاکتیس واریته های دی استی لاکتیس، لویکونستوک لاکتیس، لویکونستوک کرموریس که تولید کننده طعم هستند. بر اساس طبیعت طعم تولید شده (زنجیره های سیترات مثبت)، کالچرهای مزوفیل را می توان به ۴ گروه تقسیم نمود:

۱) نوعO: تنها شامل لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه لاکتیس و لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه کرموریس.

۲) نوع D: شامل گونه های تخمیر کننده سیترات، مانند تولید کننده های طعم تنها لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه های لاکتیس واریته های دی استی لاکتیس.

۳) نوع B (یا L): شامل گونه های تخمیر کننده سیترات، مانند تولید کننده های طعم تنها لویکونوستوک.

۴) نوع BD (یا LD): شامل هر دو تولید کننده طعم مانند لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه های لاکتیس واریته های دی استی لاکتیس و لویکونوستوک.

جدول ۱-۱- نمونه هایی از استارتر های بکار رفته برای انواع خاص پنیر (Marshal and Law, 1984)

ردیف	محصول پنیر	میکروارگانیسم بکار رفته
۱	پارامزان، رامنو	مخلوطی از لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس
۲	چدار	*L.lactis spp.lactis; L.lactis ssp. Cremoris; L.lactis ssp.lactic Var.diacetylactice.*
۳	سوییس، امنتال	مخلوطی از لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (یا لاکتوباسیلوس لاکتیس یا لاکتوباسیلوس هلوتیکوس) و استرپتوکوکوس ترموفیلوس و پروپیونی باکتریوم شرمانی
۴	پرولون	مخلوطی از گونه های لاکتوباسیلوس مقاوم به حرارت و استرپتوکوکوس ترموفیلوس
۵	آبی رکوفورتی، استیلتون	لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه لاکتیس و پنی سیلیوم رکوفورتی
۶	کاممبرت	زیر گونه لاکتوکوکوس و پنی سیلیوم کاممبرت
۷	بریک، لیمبورگر	مخلوطی از استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه کرموریس. مخلوطی از استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس. مخلوطی از لاکتو کوکوس لاکتیس زیر گونه لاکتیس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس
۸	میونستر	مخلوطی از استرپتوکوکوس ترموفیلوس و گونه های لاکتوباسیلوس
۹	گودا، ادام	لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس و لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه کرموریس و لوکونوستوک
۱۰	موزارلا	مخلوطی از گونه های لاکتوباسیلوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس
۱۱	پنیر کاتج، خامه ای	لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس و لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه کرموریس و لوکونوستوک و لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه لاکتیس واریته دی استی لاکتیس

استارتر کالچرهای مزوفیل در کارخانجات در رنج گسترده ای در انواع پنیر استفاده می شود. تخمین $\frac{۲}{۳}$ زده می شود که تخمیر شیر از نوع مزوفیل است. صنعت لبنیات در ارتباط با سویه هایی است که

تخمیر شیر را به سرعت ممکن می سازد. به نظر می رسد که این ویژگی متمایز گونه های لاکتوکوکسی از سایر گونه ها باشد که در آنها pH شیر با افت بسیار کندتری،کمتر خواهد بود (Cogan, 1996).

پس از تخمیر شیر، در طول زمان رسیدن بعدی اتولیز لاکتوکوکسی اتفاق می افتد. اتولیز سلول های استارتر منجر به مور آمینیداز[1] می شود (Beresford, 2001). اتولیز سلول ها باعث خروج آنزیم های درون یاخته ای به پنیر و تولید آمین آزاد و بنابراین موجب مقداری تغییر طعم می شود. اگر تعداد باکتری های استارتر بسیار بالا رود یا برای مدت بسیار زیادی باقی بمانند، طعم دچار نقصان شده و به تلخی می گراید که موجب افت کیفیت و ایجاد اشکال می شود.

۲- باکتری‌های اسید لاکتیک ترموفیل

این نوع باکتری ها در انواع پنیر در جایی که دمای پخت بالایی نیاز است، بکار می رود. (امنتال[2]، ، گرایر[3]، گرانا[4] و کامتی[5]).

باکتری های اسید لاکتیک ترموفیلیک متعلق به دوگونه لاکتوباسیلوس و استرپتوکوکوس هستند، اگر چه لاکتوباسیلوس گروه بزرگی است که شامل ۶۴ گونه با ویژگی های همو و هترو هستند فقط مقدار کمی از آنها در تخمیر شیر شرکت می کنند.

استارترهای لاکتوباسیلوس تجاری اساساً شامل لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه لاکتیس و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس هستند که تخمیر کننده های ضروری هستند. از سوی دیگر، استرپتوکوکوس ترموفیلوس تنها یکی از گونه های وابسته به غذا و لبنیات از میان ۲۷ گونه استرپتوکوکوس است. تا چندی پیش بدلیل ارتباط بسیار نزدیک آن را به عنوان استرپتوکوکوس سالیواریوس زیر گونه ترموفیلوس توصیف می کردند ولی بعد از آنالیز ترکیبی بیشتر DNA، دوباره آن را به سطح گونه ها افزایش دادند (Schleifer & Ludwig, 1995).

[1] Muraminidase
[2] Emmental
[3] Gryere
[4] Grana
[5] Comte

استرپتوکوکوس ترموفیلوس، لاکتوباسیلوس لاکتیس، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، گالاکتوز را متابولیزه نمی کنند و بنابراین متابولیسم لاکتوز بوسیله استرپتوکوکوس ترموفیلوس منجر به تجمع گالاکتوز در محیط می شود بنابراین پیشنهاد می شود که برای تخمیرلاکتوباسیلاسه گالاکتوز باید استرپتوکوکوس ترموفیلوس به عنوان استارتر توأم بکار رود (Mayra-Makinen & Bigret, 1998).

۳- باکتری‌های اسید لاکتیک طبیعی یا صنعتی

کالچرهای صنعتی حاصله از بچ قبلی محصول تخمیری برای تلقیح به بچ جدید مورد استفاده قرار می گیرد. به عنوان مثال، کوپانیستی[1]، که یک نوع پنیر یونانی است بوسیله اختلاط پنیر بچ قبلی با لخته آب گیری شده بچ جدید حاصل می شود. برای برخی از انواع پنیر ایتالیایی و سوئدی، آب پنیر تولیدی روزهای گذشته در شرایط انتخابی نظیر دمای انکوباسیون بالا و pH پایین به جهت دستیابی به «استارتر وی» انکوبه می شود. شواهد بیانگر آن است که ترکیب آنها بسیار پیچیده، نسبتاً ناپایدار و اغلب نامشخص است. چندین نوع گونه ممکن است در آن حضور داشته باشند، اگرچه عملکرد متغیر آنها با روند فعلی در تکنولوژی استارتر متمایز است اما در جایی که نیاز به ثبات عملکرد است جایگزینی بوسیله سیستمهای استارتر تعیین شده، گاهی منجر به تولید طعم کمتر می گردد (Axelsson, 1998).

در این گروه در کنار استارتر های کلاسیک، گونه های انتروکوکوس اغلب در تعداد معنی داری وجود دارند. آنها دارای برخی مزایا، همچون تولید سریع اسید، مقاومت در برابر حرارت پخت، مقاومت بالا به نمک می باشند. یکی از معایب اصلی آنها این است که منشأ مدفوعی داشته و برخی از گونه ها بعنوان پاتوژن مطرح شده است. به هرحال، این استدلال وجود دارد که حضور انتروکوکسی نشان دهنده فلور میکروبی غالب پنیر های سنتی حاصله از شیر خام است و بایستی به عنوان استارتر به منظور تولید ویژگی های بارز بکار گرفته شود(Lopez- diaz et al., 2000).

[1]Kopanisti

انتروکوکوس فکالیس به منظور تسریع در رسیدن و بهبود ویژگی های ارگانولپتیک پنیرها بکار گرفته شده بود. (Coppala et al., 2000)

۱-۱-۱- راسته لاکتوباکتریاسه

۱-۱-۱-۱- جنس لاکتوباسیلوس

از میان باکتری های اسید لاکتیک، لاکتوباسیلوس ها نقش مهمی در فرآیند تخمیر داشته و نسبت به باکتری های اسید لاکتیک کوکسی، در طول تخمیر توانایی تولید مقدار بیشتری اسید لاکتیک را دارند (Zue & Zhang, 2000).

جنس لاکتوباسیلوس شامل گونه‌های متنوعی می باشد، بجز تعداد اندکی از جنس های این خانواده که پاتوژن هستند بقیه جنسها غیر پاتوژن بوده و عموماً به عنوان ایمن[1] در نظر گرفته می شوند (Tamime, 2005).

برخی از سویه های باکتری های اسید لاکتیک، خاصیت پروبیوتیکی دارند. لاکتوباسیلها باکتری‌های میله ای شکل دراز یا کوتاه به طول ۱/۵- ۱۱ و عرض ۰/۵ - ۱/۶ میکرون می‌باشند این باکتری‌ها سیتوکروم و کاتالاز ندارند ولی درمجاورت اکسیژن هوا رشد می‌کنند و میکروآئروفیل بوده، در حضور هوا رشد کمی دارند وجود ۵٪ دی‌کسیدکربن در محیط باعث تحریک رشد آنها می‌شود. این باکتری ها اکسیژن را فقط به وسیله اکسیدازها و پراکسیدازها مورد استفاده قرار می دهند. دمای بهینه رشد آنها بین ۳۰- ۴۰ درجه سلسیوس می‌باشد اما توانایی رشد تا دمای ۵۰-۵۳ درجه سلسیوس را نیز دارند. لاکتوباسیل‌ها قدرت تحمل اسید را در محیط داشته و اگرچه pH بهینه برای رشد آنها ۵/۵-۸/۵ می‌باشد اما بطور کلی در pH کمتر از ۵ نیز قادر به رشد هستند و ساکارولیتیک بوده یعنی برای تامین انرژی، هیدراتهای کربن را مورد استفاده قرار داده، اسید لاکتیک تولید می‌کنند. برخلاف آنترو باکتریاسه که آنها هم اسید لاکتیک تولید می‌کنند، لاکتوباسیل‌ها تخمیرکننده اجباری هستند (نوحی،۱۳۶۷؛ نجف نجفی و نخچیان،۱۳۸۲).

[1]Generally Recognized as Safe

ممکن است هومو یا هترو فرمنتاتیو باشند. گونه های هتروفرمنتاتیو ممکن است با توجه به تشکیل اسید لاکتیک DL، از گونه های لویکونوستک متمایز شوند. در طبقه بندی اورلاجنسن[1]به سه گروه تقسیم می شوند:

گروه ۱: هومو فرمنتاتیو که در طبقه بندی اورلا جنسن جزء دسته ترمو باکتریا قرار می گیرند.

گروه۲: هومو فرمنتاتیو که در طبقه بندی اورلا جنسن وابسته به استرپتو باکتریا هستند.

گروه۳: هترو فرمنتاتیو هستند که هگزوزها را به اسید لاکتیک و استیک تخمیر می کنند و به گروه بتا باکتریوم تعلق دارند (نجف نجفی و نخچیان،۱۳۸۲).

دسته بندی دیگری که برای باکتری های اسید لاکتیک در نظر گرفته می شود بر اساس اپتیمم درجه حرارت رشد و تکثیر است که به دو گروه تقسیم می شوند:

ترموفیل ها: دمای مناسب برای رشد و تکثیر آن ها بین ۳۷ تا ۴۵ درجه سانتی گراد می باشد.

مزوفیل ها: دمای مناسب برای رشد و تکثیر آن ها بین ۲۸ تا ۳۲ درجه سانتی گراد می باشد.

درجه حرارت اپتیمم رشد و تکثیر اکثر لاکتوباسیلوس های هموفرمنتاتیو در حدود ۳۷ درجه سانتی گراد یا بالاتر قرار دارد (مرتضوی و همکاران، ۱۳۸۴).

کلنی های لاکتوباسیلوس روی کشت آگار معمولاً کوچک به اندازه ۲ تا ۵ میلی متر با حاشیه کامل، محدب، صاف، درخشان یا کدر و بدون پیگمان است. در موارد نادر پیگمانشان مایل به زرد و یا قرمز شده و برخی گونه ها نیز فرم کلونی هایشان خشن است (Hammes & Hertel, 2009).

خصوصیاتی که موجب اهمیت لاکتوباسیلوس ها در صنایع غذایی می گردند عبارتند از:

۱- توانایی تخمیر قندها و ایجاد مقدار قابل توجهی اسید لاکتیک این امکان را بوجود می آورد که آنها در صنایع لبنی و فرآورده های تخمیری گیاهی و یا این که در صنایع برای تهیه اسید لاکتیک خالص مورد استفاده قرار گیرند. هر چند که ایجاد این اسید در برخی صنایع مثل شراب و آبجو سازی، آبمیوه و شیر پاستوریزه مطلوب نمی باشد.

[1]Orla-Jensen

۲- به علت تولید گاز و یا دیگر ترکیبات فرار به وسیله باکتری های گروه هتروفرمنتاتیو که موجب کاهش کیفیت مواد غذایی می شوند از جمله لاکتوباسیلوس فرمنتی بر روی پنیرهای سوییسی یا لاکتوباسیلوس هیلگاردی و لاکتوباسیلوس تریشودش در شراب.

۳- عدم توانایی در سنتز ویتامینهای مورد نیاز خود که در مواد غذایی که از این نظر دارای کیفیتی پایین هستند بخوبی رشد و تکثیر نکنند، اما از طرف دیگر از آن ها می توان برای تعیین میزان ویتامین ها استفاده نمود.

۴- وجود گونه های ترمودیوریک[1]موجب می گردد که برخی از لاکتوباسیلوس های درجه حرارت پاستوریزاسیون یا فرآیندهای حرارتی مشابه را تحمل نمایند (مرتضوی و همکاران، ۱۳۸۴).

۱-۱-۱-۱-۱-طبقه‌بندی سنتی لاکتوباسیلوس‌ها

برای نخستین بار در سال ۱۹۰۱ توسط بیژرنیک[2] لاکتوباسیل‌ها به عنوان یک جنس مجزا در طبقه‌بندی باکتری‌ها در نظر گرفته شدند (Vandamme et al., 1996). سپس طبقه‌بندی اورلا-جنسن، اعضا این جنس را بر اساس قابلیت رشد در دمای ۱۵ و ۴۵ درجه سانتی گراد و الگوی تمییز قندهای پنج و شش کربنه و همچنین تولید گاز از گلوکز از سطح جنس به زیر جنس‌های ترموباکتر[3]، استرپتوباکتر[4] و بتاباکتر[5] طبقه‌بندی کرد، این طبقه‌بندی در چاپ هشتم کتاب برجی (برگی) منتشر گردید (Vandamme et al., 1996؛ Kandler & Weiss,1986). بر اساس این طبقه‌بندی لاکتوباسیلوس‌های تخمیر همگن که توانایی رشد در دمای ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی گراد را دارند زیر جنس ترموباکتریوم در نظر گرفتند.

اعضا این زیرجنس به دلیل حضور آنزیم فروکتوز ۱ و ۶ دی فسفات آلدولاز[6] بوده می‌توانند هگزوزها را تقریباً به طور انحصاری از مسیر گلیکولیز[1] به دو ملکول پیروات[2] و سپس دو ملکول لاکتات و ۲

---

[1]Thermoduric
[2]. Beijernik
[3] . Themobacter
[4] . Streptobacter
[5] . Betabacter
[6] . Fructose-1,6 biphosphate aldolose

ملکولATP[3] تخمیر کنند در حالی‌که توانایی تخمیر قندهای ۵ کربنه و تولید گاز از گلـوکز را ندارنـد (Vandamme et al., 1996 ; Hayakawa & Nakazawa, 1992; Kandler & Weiss,1986).

گونه‌های متعلق به این گونه را می‌توان بر اساس ساختار بازهای آلی موجود در ملکول DNA به دو گروه دارای ۳۴ تا ۳۸ درصد مولی CTG و ۴۸ تا ۵۰ درصد مولی CTG تقسیم نمود.

لاکتوباسیلوس‌های تخمیر ناهمگن اختیاری که قادر به تخمیر طیف گسترده‌ای از قندهای پنج و شش کربنه هستند و قابلیت رشد در دماهای مختلف از ۱۵ تا ۳۷ درجه سانتی گراد را دارند استرپتوباکتریوم نامیده شدند. این گروه، هگزوزها را با استفاده از چرخه EMP[4] به لاکتات تبدیل می‌کنند اما در شرایط کمبود گلوکز علاوه بر اسید لاکتیک متابولیت هایی چون اسید استیک، اتانول و اسید فرمیک در محیط رشد آن‌ها تجمع می‌نماید (Vandamme et al., 1996).

آخرین زیر جنس بر اساس طبقه‌بندی فوق، لاکتوباسیلوس‌های ناهمگن تخمیر اجبـاری[5] هسـتند کـه مانند گروه قبل بهینه دمای رشد ۳۷ درجه سانتی گراد دارند (Kandler & Weiss, 1986) و از طرفی فاقد آنزیم فروکتوز ۱ و ۶ دی فسفات آلدولاز می‌باشند. این گروه که بتاباکتریوم نامیده شدند هگزوزها را از چرخه فسفوگلوکونات[6] تخمیر می‌نماید و همزمان با تخمیر گلوکز اسیدهای لاکتیـک و اسـتیک، همچنین اتانول و گاز دی اکسید کربن و همراه با تخمیر پنتوزها اسید لاکتیک و اسید اسـتیک تولیـد می‌کنند. در هر دو چرخه مذکور آنزیم عامل پنتوز فسفو کتولاز می‌باشد (Badis et al., 2004).

یکی از ایرادات این نوع طبقه‌بندی، شاخص قرار دادن دمای رشد گونه‌ها بود در حالی که نتایج مطالعات متفاوت نشان داد که توانایی رشد در دماهای متفاوت نمی‌تواند معیار صحیحی برای طبقه‌بندی لاکتوباسیلوس‌ها باشد. برای مثال در این طبقه‌بندی با وجود اینکه لاکتوباسیلوس فرمنتوم[7] و لاکتوباسیلوس روتری که هر دو از گونه‌های نزدیک به هم بوده و جزء سویه‌های متعدد پروبیوتیک

---

[1] . Glycolysise
[2] . Pyruvate
[3]. Adenosine Three Phosphate
[4]Embeden-Myerhof-Pathway
[5] . Obligatory Heterofermentative
[6] . Phospho Gluconate
[7] . *Lactobacillus Fermentum*

شناسایی شده‌اند به دلیل تفاوت در قابلیت رشد در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به عنوان گونه‌های مجزا در نظر گرفته شدند (Kandler & Weiss, 1986; Sharpe, 1979). از طرفی سویه‌های این گونه که از محیط‌های متفاوت جداسازی شده‌اند در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد توانایی رشد متفاوتی نشان دادند. در مثال دیگر می‌توان به لاکتوباسیلوس ویریدنس[۱] و لاکتوباسیلوس کانفیوسوس[۲] اشاره نمود که هر دو آن‌ها به دلیل قابلیت رشد در دمای ۵ درجه سانتی گراد از اعضاء زیر جنس بتاباکتر در نظر گرفته شدند در حالی که لاکتوباسیلوس کانفیوسوس نه تنها از نظر ترکیب ژنی بلکه از نظر پروفیل تخمیر قند و تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی که منجر به تشکیل لایه لزج مانند در سطح محیط رشد می‌شود به جنس لوکونوستوک[۳] شباهت دارد (Hayakawa & Nakazawa, 1992). مشکل فوق در طبقه‌بندی، موجب شد در نسخه بعدی کتاب برجی گروه‌های لاکتوباسیلوس با اعداد ۱ تا ۳ و با حروف یونانی مشخص شوند. در این نوع طبقه‌بندی هر چند توانایی رشد در دماهای ۱۵ تا ۴۵ درجه سانتی گراد به عنوان یک خصوصیت عمومی برای اعضا هر یک از ۳ گروه مطرح شده است اما ملاکی برای طبقه‌بندی لاکتوباسیلوس‌ها نیست و گروه بندی منحصراً بر اساس تفاوت درنحوه تخمیر انجام گرفته است (Amatayakul et al., 2006). در این طبقه بندی با حفظ سه گروه اصلی مورد استفاده در طبقه بندی سنتی کلمه زیرجنس نیز در نامگذاری مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. در این نوع طبقه‌بندی همچنین خصوصیاتی مانند مجموع ترکیب بازهای آلی سیستوزین و گوانین، نیازهای غذایی، ترکیب دیواره و غشاء سلولی، واکنش‌های ایمونولوژیکی، نقشه الکتروفورز آنزیم‌ها و توالی سنتز DNA[۴]به عنوان شاخص‌های قابل استفاده در شناسایی و طبقه‌بندی لاکتوباسیلوس‌ها مطرح شده است (Kandler & Weiss,1986). با این حال تا دهه اخیر بسیاری بر این باور بودند که پروفیل تخمیر قندها و تولید گاز از گلوکز، قابلیت رشد و تولید اسید در شیر و تشخیص ایزومر نوری اسید لاکتیک

---

[1] . *Lactobacillus Viridanse*
[2] . *Lactobacillus Canfusus*
[3] . *Leuconostock*
[4]DNA Sequence

تولیدی همچنان ابزارهای قابل اطمینانی برای شناسایی لاکتوباسیلوس‌ها در سطح گونه می‌باشد (Vandamme et al., 1996 ; Hayakawa & Nakazawa, 1992).

هر چند امروزه اساس طبقه‌بندی لاکتوباسیلوس‌ها هنوز به شکل سنتی باقی مانده است اما استفاده از تکنیک‌های جدید مولکولی[1] همزمان با ردیابی ارتباط فیلوژنی[2] گونه‌ها از طریق مناطق حفاظت شده ژنتیکی باعث شده ارتباط خانوادگی آن‌ها از منشأ مشخص شده و تغییرات اساسی در گروه بندی گونه‌ها و زیرگونه‌ها ایجاد شود (Sharpe,1979). با این حال بکارگیری چنین روش‌هایی در ترکیب با روش‌های سنتی راهبردی دقیق برای میکروارگانیسم‌ها قلمداد می‌شود (Vandamme et al., 1996).

۱-۱-۱-۱-۲- طبقه‌بندی مدرن لاکتوباسیلوس ها

ردیابی روابط فیلوژنیک میکروارگانیسم‌ها از طریق بررسی توالی نوکلئوتیدی ساختمان ژنی اصول طبقه‌بندی مدرن را تشکیل می‌دهد. در این رابطه بررسی توالی نوکلئوتیدی در ژن DNA به دلایل زیر به عنوان شاخصی معتبر مورد قبول همگانی قرار گرفته:

- درکلیه میکروارگانیسم‌ها وجود دارد.
- کارایی و وظایف آن در متابولیسم سلول پایدار و ثابت است.
- بسیاری از توالی نوکلئوتیدی حفاظت شده و غیر حفاظت شده ثابت و پایدار در آن وجود دارد.

در طبقه‌بندی مدرن روش‌های سنتی تعیین توالی ژنتیکی DNA به تدریج جای خود را به استفاده از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز[3] (PCR) و آغازگرهای[4] مناسب جهت ازدیاد قطعه یا قطعاتی از ملکول (23S rDNA) یا (16S rDNA) داده‌اند (Vandamme et al., 1996; Ammor et al., 2007).

---

[1] . Molecular techniques
[2] . Phylogenic relations
[3] . Polymerase chain Reaction
[4] . Primers

با وجود اینکه روش‌های مدرن، روش‌های کاملاً صحیح و دقیقی شناخته شده‌اند اما گویای بسیاری از خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نمی‌باشند. خصوصیاتی که زیربنای طبقه‌بندی سنتی لاکتوباسیلوس‌ها را تشکیل می‌داد (Vandamme et al., 1996).

طبقه‌بندی مدرن، لاکتوباسیلوس‌ها را به سه گروه اصلی زیر تقسیم می‌کنند:

- لاکتوباسیلوس دلبروکی
- لاکتوباسیلوس کازئی- پدیوکوکوس
- لاکتوباسیلوس- لوکونوستوک

۱-۱-۱-۱-۳- سازگار نمودن طبقه‌بندی سنتی و مدرن لاکتوباسیلوس ها

سازگار نمودن طبقه‌بندی سنتی لاکتوباسیلوس‌ها که بر اساس خصوصیات فنوتیپی[1] آن‌ها بنا شده است با گروه بندی فیلوژنیک آن‌ها که از اطلاعات نوین ساختار RNA ریبوزمی[2] حاصل شده است توسط همس و وگل انجام شد که در راستای این تطابق زیرگروه‌هایی در ساختار قدیم پیشنهاد کردند. در زیرگروه‌های جدید نشان پیوستگی به ساختار قدیم به وسیله حروف بزرگ (C,B,A) مشخص شدند که شکل تخمیر را نشان می‌دهد در حالی که حروف کوچکی (c,b,a) نشان دهنده سه شاخصه فیلوژنیک است که می‌تواند در هر سه گروه اصلی تخمیری وجود داشته باشد. در گروه A ترموباکترها از طبقه‌بندی سنتی و گروهی از انواع گونه‌های جدید قرار می‌گیرند. کلیه لاکتوباسیلوس‌های این گروه به دو زیر گروه فیلوژنیک تقسیم می‌شوند.

زیرگروه اول: Aa شامل لاکتوباسیلوس دلبروکی[3] و زیرگروه دوم در برگیرنده لاکتوباسیلوس کازئی پدیوکوکوس[4] می‌باشند. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در گروه Aa قرار گرفته است. بکارگیری انواع مختلفی از روش‌های مولکولی و پیشرفته تفاوت‌های قابل توجهی را میان تعداد زیادی از سوش هایی که با ارزیابی فنوتیپی به این گونه نسبت داده می‌شدند نشان داده است. تفاوت‌های مشاهده شده در

---

[1] .Phenotypic Properties
[2] . rRNA
[3] . *L.Delbrueeki*
[4] . *L.Casei-Pedioccocus*

این زمینه به حدی است که قرار گرفتن سوش‌های مذکور را در گونه‌ای جدا توجیه پذیر می‌سازد. انتقال تعدادی از گونه‌هایی مانند لاکتوباسیلوس استوتولورنس[1]، لاکتوباسیلوس آمیلوفیلوس[2] و لاکتوباسیلوس همستری[3] از گروه لاکتوباسیلوس دلبروکی و ترموباکترها به گروه Ba از تخمیرهای ناهمگن اختیاری یکی از تغییرات اساسی بود که در طبقه‌بندی همس و وگل پس از طبقه‌بندی سنتی به وجود آمده است. این انتقال به دلیل تخمیر قندهای ۵ کربنی توسط گونه‌های فوق انجام گرفت. آنچه در طبقه‌بندی سنتی برای گروه استرپتوباکترها ذکر شده است، اغلب گونه‌های زیرگروه دوم در گروه Bb را نیز پوشش می‌دهد و اکثر گونه‌های برشمرده در گروه فوق را در برمی‌گیرد Hammes & (Vogel, 1995).

در گروه C، ۱۲ گونه لاکتوباسیلوس در دو شاخه Cb، وابسته به شاخه لاکتوباسیلوس کازئی – پدیوکوکوس و Cc مرتبط با شاخه لویکونوستوک طبقه‌بندی شده‌اند. در این نوع طبقه‌بندی بعضی از گونه‌های طبقه‌بندی شده در زیر گروه‌های طبقه‌بندی سنتی مانند لاکتوباسیلوس کنفیوسوس[4]، لاکتوباسیلوس ماینور[5]، و لاکتوباسیلوس ویریدنس از جنس لاکتوباسیلوس خارج و تحت جنس ویسیلا قرار گرفتند (Vandamme,et al., 1996).

- در این بخش به معرفی مختصری در خصوص برخی از اعضای جنس لاکتوباسیلوس که در تکنولوژی کاربرد دارند می پردازیم:

۱) لاکتوباسیلوس لاکتیس: استارتری ترموفیل است و در تولید پنیر سوییسی و ایتالیایی به همراه سایر استارترها مورد استفاده قرار می گیرد. در ترکیب با لاکتوکوکوس لاکتیس بیو واریته دی استی لاکتیس، در تولید کره با میزان چربی پایین، به کار می رود. برخی گونه ها ممکن است به وسیله سایکروتروف ها در دمای ۵ تا ۷ درجه سانتی گراد بازداشته شوند. دمای مطلوب رشد ۴۰ تا ۴۳ درجه سانتی گراد است.

---

[1] . *L.Acetotolerance*
[2] . *L.Amylophilus*
[3] . *L.Hamstery*
[4] . L.Confusus
[5] . L.Minor

۲) لاکتوباسیلوس بولگاریکوس: استارتری است ترموفیل که در ترکیب با سایر استارترها برای تولید ماست، پنیرهای سوییسی و ایتالیایی (مانند گرانا) به کار می رود. برخی از گونه ها توانایی غیر فعال کردن عوامل موتاژنیک را دارا می باشند. به ویتامین ها و اسید های آمینه برای رشد نیاز دارند و دمای مطلوب رشد تقریباً ۴۰ درجه سانتی گراد می باشد.

۳) لاکتوباسیلوس هلوتیکوس: استارتری ترموفیل است که در ترکیب با سایر استارتر ها برای تولید پنیرهای سوییسی و ایتالیایی به کار می رود. شوک حرارتی این باکتری سبب کوتاه شدن دوره رسیدگی پنیر تا میزان یک یا دو ماه خواهد شد. دمای رشد مطلوب آنها تقریباً ۴۵ درجه سانتی گراد است.

۴) لاکتوباسیلوس ژژورتی: به عنوان استارتر ماست می باشد. واکنش های سرولوژیکی و شیمیایی آنها همانند لاکتوباسیلوس هلوتیکوس می باشد.

۵) لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس: استارتری ترموفیل است که در تولید شیر اسیدوفیلوس استفاده می گردد. همچنین با استارترهای مزوفیل برای تولید کفیر مورد استفاده قرار می گیرد. در ترکیب با بیفیدو باکتریوم بیفیدوم برای تولید یک نوع بستنی به عنوان یک غذای سالم استفاده می گردد. این ارگانیسم خواص درمانی زیر را داراست:

الف- تولید مواد ضد میکروبی (آنتی بیوتیک ها، آب اکسیژنه و اسید لاکتیک)

ب- هیدرولیز لاکتوز در شیرکشت داده که آن را برای افراد فاقد تحمل لاکتوز مناسب می سازد.

ج- کاهش کلسترول خون

د- جایگزینی میکروفلور طبیعی روده بعد از درمان با آنتی بیوتیک.

به منظور ایجاد محصولی مطلوب حداقل صد هزار از این باکتری مورد نیاز است.

برای رشد، نیاز به برخی ویتامین ها و اسیدهای آمینه دارند و دمای مطلوب رشد در حدود ۴۵ درجه سانتی گراد می باشد (نجف نجفی و نخچیان، ۱۳۸۲).

این باکتری یکی از مفید ترین گونه های لاکتوباسیلوس می باشد که بـه عنـوان یـک میکروارگانیسـم پروبیوتیک در محصولات لبنی مانند ماست، شیر و بخش هایی از دسـتگاه گـوارش پسـتانداران نظیـر روده انسان دیده می شود (ایزدی و همکاران، ۱۳۸۹).

۶) لاکتوباسیلوس کازئی: استارتری مزوفیل است که در تولید یاکولت[1] به کار می رود. ممکن است به همراه کاندیدا لیپولیتیکا و لاکتوباسیلوس لاکتیس به منظور تولید یک افزودنی با طعم پنیر برای تولید پنیرهای پروسس[2] به کار روند.

۷) لاکتوباسیلوس پلانتاروم: در فرآیند رسیدن پنیر مورد استفاده قرار می گیرد. از فرآورده های لبنی، سیلاژها قابل جداسازی است.

۸) لاکتوباسیلوس کورواتوس: از شیر و سیلاژ قابل جداسازی است.

۹) لاکتوباسیلوس برویس: استارتر مزوفیل است که در ترکیب با دیگر استارترها برای تولید کفیـر بـه کار می رود. در ۱۵ درجه سانتی گراد رشد می کند اما قادر به رشد در ۴۵ درجه سـانتی گـراد نمـی باشد. درجه حرارت مطلوب رشد ۳۰ درجه سانتی گراد است.

۱۰) لاکتوباسیلوس فرمنتوم: از شیر و فرآورده های تخمیری جدا شده است. برای رشد نیاز به برخـی از اسیدهای آمینه و ویتامین ها دارد. در ۴۵ درجه سانتی گراد می کنند اما قادر به رشد در ۱۵ درجه سانتی گراد نمی باشند. درجه حرارت مطلوب برای گونه های جوان ۴۱ تا ۴۲ درجه سانتی گراد است (نجف نجفی و نخچیان،۱۳۸۲).

۱-۱-۱-۲- جنس پدیوکوکوس

دومین جنس خانواده لاکتوباکتریاسه پدیوکوکوس ها می باشند. این جنس شامل میکروارگانیسم های کوکسی، گرم مثبت، غالباً کاتالاز منفی، غیر اسپورزا، فاقد سیتوکروم، غیر متحرک، قادر به احیای نیترات نیستند و به صورت میکروائروفیل (بی هوازی اختیاری) زندگی می کنند. پدیوکوک ها مواد قندی را به طریقه هموفرمنتاتیو تخمیر می کنند (تولید اسید بدون گاز). از مشخصات دیگر این

[1]Yakult
[2]Process Cheese

باکتری ها رشد و تکثیر آن ها در غلظت های بالای نمک طعام تا حدود ۱۰ درصد و تحمل دامنه وسیعی از حرارت (۷ تا ۴۵ درجه سانتی گراد) می باشد. مهم ترین گونه های این جنس پدیوکوکوس سرویزیه و پدیوکوکوس اسیدی لاکتیس هستند که بخصوص می توان آن ها را از آبجوی ترش شده جدا نمود. بنابراین حضور این باکتری ها در صنایع آبجوسازی غیر مطلوب ولی در تهیه ساورکرات و خیارشور مفید می باشد.

۱-۱-۲- خانواده استرپتوکوکاسه

۱-۱-۲-۱- جنس استرپتوکوکوس

این جنس دربرگیرنده ارگانیسم های کروی شکل که ممکن است به فرم بیضوی، به صورت دو تایی و یا زمانی که در محیط کشت مایع رشد می کنند می توانند به صورت زنجیر های کوتاه و بلند دنبال هم قرار گیرند. این باکتری ها گرم مثبت، کاتالاز منفی، غیر اسپورزا، غیر متحرک و در طبیعت به صورت میکروآئروفیل (بی هوازی اختیاری) زندگی می کنند. کربوهیدرات ها را به طریقه هموفرمنتاتیو تجزیه نموده و ایجاد اسید کرده ولی گاز تولید نمی کنند. یک سیستم طبقه بندی که بر اساس خصوصیات فیزیولوژی ارگانیسم ها استوار است از طرف شرمن پیشنهاد شده است با این روش طبقه بندی می توان استرپتوک ها را در ۴ گروه تقسیم بندی نمود (جدول ۱-۱) (مرتضوی و همکاران ،۱۳۸۴).

۱-۱-۲-۱-۱- استرپتوکوک های پیوژن

این باکتری ها در بخش بالایی دستگاه تنفسی، چرک های پوستی، ترشحات بخش های ملتهب و همچنین در خون یافت می شوند (نجف نجفی و نخچیان، ۱۳۸۲).

این گروه از استرپتوکوک ها شامل گونه های بیماریزا برای انسان و حیوانات می باشد مانند استرپتوکوکوس پیوژنس. این باکتری ها از نظر حرارتی مزوفیل هستند و در حرارت پائین تر از $۱۰^{\circ}C$

و یا بیشتر از ۴۵°C رشد و تکثیر نمی کنند. بعضی از باکتری های این گروه در شیرخام یافت می شوند.

۱-۱-۲-۱-۲- استرپتوکوک های ویریدانس:

این گروه استرپتوکوک ها شامل ارگانیسم هایی است که در مخاط و بزاق یافت می شوند. استرپتوکوکوس ترموفیلوس که به علت حساسیت فوق العاده در مقابل نمک طعام و تحمل حرارت پاستوریزاسیون معروف است در این گروه قرار دارد. اپتیمم درجه حرارت رشد و تکثیر این ارگانیسم حدود ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی گراد است. استرپتوکوکوس ترموفیلوس به خصوص در شیر و فرآورده های لبنی وجود دارد. از این باکتری در مایه ماست و بعضی از پنیرها استفاده می کنند. (مرتضوی و همکاران ،۱۳۸۴).

۱-۱-۲-۱-۳- انتروکوک ها

کوکسی های گرم مثبت کاتالاز منفی می باشند که به عنوان فلور طبیعی دستگاه گوارش تلقی می گردند (Marothi & Agnihotri, 2005).

نام این گروه استرپتوکوک ها (انتروکوک) به علت حضور آن ها در روده می باشد و به همین علت هم در بعضی مواقع به آن ها استرپتوکوک های روده ای اطلاق می گردد. انترو کوک ها معمولا ساپروفیت هستند اما خارج از محیط معمولی زندگی خود ممکن است به صورت بیماریزا عمل کرده و موجب التهابات و عفونت در اعضای مختلف بدن شوند. علاوه بر این در فساد گوشت، فرآورده های لبنی، سبزیجات و مرباجات و مواد غذایی دیگر دخالت دارند. انترو کوک ها ممکن است که گاهی باعث بروز مسمومیت های غذایی غیر متداول گردند (مرتضوی و همکاران، ۱۳۸۴).

این باکتری ها در ایجاد عفونت های بیمارستانی به خصوص عفونت های دستگاه ادراری، عفونت های داخل شکمی و عفونت های لگنی نقش اساسی دارند (Marothi & Agnihotri, 2005).

۱-۱-۲-۱-۴- استرپتوکوکوس لاکتیس

شامل دو گونه مفید و مهم در صنایع غذایی بخصوص در صنایع لبنی می باشد. استرپتوکوکوس لاکتیس و استرپتوکوکوس کرموریس از نظر احتیاجات حرارتی در ۱۰ درجه سانتی گراد رشد و تکثیر می نمایند ولی در ۴۵ درجه سانتی گراد رشد آنها متوقف می گردد. نمک طعام را تا غلظت ۴۵٪ می توانند تحمل کنند. علاوه بر تولید اسید لاکتیک عطر و طعم نیز ایجاد می کنند و از آنها به عنوان مایه کشت در تهیه کره و پنیر استفاده می شود.

۱-۱-۲-۲- لاکتوکوکسی ها:

جنس لاکتوکوکوس از برخی استرپتوکوکسی‌های لاکتیکی، لاکتوباسیلوس‌های خاص و نیز تعدادی گونه جدید تشکیل شده است (مرتضوی و همکاران ۱۳۸۴).

این جنس شامل لاکتوکوکوس لاکتیس، کرموریس و دی استی لاکتیس می باشد در ذیل به طور مختصر در خصوص هر یک توضیح داده می شود:

۱) لاکتوکوکوس لاکتیس: یکی از مهمترین اعضای گروه باکتری های اسید لاکتیک است. گونه هایی از لاکتوکوکوس لاکتیس آنتی بیوتیک نایسین تولید می کنند که رنج بازدارندگی گسترده ای بر علیه باکتری های گرم منفی دارد (Benech et al.,2002).

مطالعات زیادی نشان داده که نایسین روی گونه های باکتری های گرم منفی همچون *L.Monocytogenes* در غذاها بازدارندگی دارد (Jozala et al., 2005؛ Benech et al.,2002).

این باکتری استارتری مزوفیل است که به تنهایی یا به همراه سایر استارترها در تولید پنیر های سخت مانند چدار، گودا و بسیاری از انواع دیگر به کار می رود. در طبقه بندی لانسفیلد در گروه Nقرار می گیرند. قادر به تولید دی استیل و دی اکسید کربن از سیترات نیستند اما از آرژنین، آمونیاک آزاد می کنند. رشد مطلوب در ۳۰ درجه سانتی گراد صورت می گیرد.

۲) لاکتوکوکوس کرموریس: سابقاً استرپتوکوکوس کرموریس نامیده می شد. استارتری مزوفیل است که به تنهایی یا در ترکیب با دیگر استارترها در تولید پنیر های سخت، رسیده، رسیده –

نرم، فتا و بسیاری دیگر از پنیرها به کار می رود. در گروه N لانسفیلد قرار دارد و در ۳۰ درجه سانتی گراد رشد مطلوبی دارد.

۳) لاکتوکوکوس دی استی لاکتیس: سابقاً استرپتوکوکوس دی استی لاکتیس نامیده می شد. استارتری مزوفیل است که به تنهایی یا در ترکیب با سایر استارترها برای تولید پنیرهای سخت کپکی، رسیده، نرم- رسیده، کاتج، کره با چربی پایین و کره کشت داده شده، دوغ، کوآرگ[1] و بسیاری محصولات دیگر استفاده می گردد. در گروه N لانسفیلد طبقه بندی می شود. قادر به تولید دی استیل و دی اکسید کربن می باشند، به علاوه اسید استیک از سیترات تولید می کنند که رشد سودوموناس ها، کلی فرم ها و سالمونلا را کاهش می دهد. در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد رشد مطلوبی دارند (نجف نجفی و نخچیان، ۱۳۸۲).

۱-۱-۳- لویکونوستک ها:

سلول های کروی به صورت جفت یا زنجیره ای هستند. این باکتری ها غیر متحرک، گرم مثبت، غیر اسپورزا، بی هوازی اختیاری و مزوفیل هستند. هتروفرمنتاتیو بوده و در کنار تولید لاکتات، دی اکسید کربن و ترکیبات آروماتیک هم تولید می کنند (Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004).

گونه های مهم آن عبارتند از:

- لویکونوستک مزنتروئیدس: این میکرو ارگانیسم در شیر و فرآورده های لبنی، محلول های قندی لزج و در میوه ها و سبزی ها یافت می شود. دکستران تولید شده توسط برخی از گونه ها، ممکن است به عنوان تثبیت کننده بستنی به کار رود. دمای رشد مطلوب ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی گراد می باشد.

[1]Quarg

- لویکونوستک دکسترانیکوم: در شیر، فرآورده های لبنی و بر روی میوه ها و سبزی ها وجود دارد. از ساکارز، دکستران تولید می کند و نسبت به گونه مزنتروئیدس فعالیت کمتری دارد. در دمای ۱۰ تا ۳۷ درجه سانتی گراد با اپتیموم ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی گراد رشد می کنند.

- لویکونوستک کرموریس: استارتری مزوفیل می باشد که به همراه استارتر های دیگر در تولید پنیر کاتج و خامه ای، کره کشت داده شده، دوغ و کوآرگ به کار می رود. قادر به تولید دکستران از ساکارز و اسید از فروکتوز، آرابینوز و ترهالوز نمی باشد. از سیترات، اسید استیک تولید می کند و ممکن است به پنیر کاتج اضافه گردد. این عمل به منظور جلوگیری از فساد پنیر و تولید لایه شبه اسلایم می باشد. محدوده دمایی رشد ۱۰ - ۳۰ درجه سانتی گراد با اپتیموم ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی گراد می باشد.

- لویکونوستک پارامزنتروئیدس: در شیر و فرآورده های لبنی و سبزی های تخمیری وجود دارد که به همراه دیگر استارترها برای تولید پنیر شور به کار می رود. از ساکارز دکستران تولید نمی کند و برخی گونه ها ممکن است از آرابینوز اسید تولید کنند. دمای رشد مطلوب آنها ۳۰ درجه سانتی گراد است.

- لویکونوستک لاکتیس: در شیر و فرآورده های لبنی یافت می شوند. دکستران تولید نمی کنند، اما قادر به تولید اسید از فروکتوز می باشند. مقاومت حرارتی بالاتری نسبت به سایر گونه ها دارند و سلول ها ممکن است در ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه زنده بمانند. دمای رشد ۱۰ تا ۴۰ درجه سانتی گراد با اپتیموم ۳۰ درجه سانتی گراد دارند (نجف نجفی و نخچیان،۱۳۸۲).

۱-۲- تاریخچه شناسایی پروبیوتیک ها

واژه پروبیوتیک" به معنای زندگی"، از زبان یونانی مشتق شده است (Lilly & Stillwell,1965). به نظر می رسد تعریف زیر به عنوان یک تعریف جامع در مورد پروبیوتیک ها مطرح باشد: فرآورده یا محصولی حاوی میکروارگانیسمهای زنده و مشخص در تعداد کافی (Ehsani et al., 2011; Saxelin et al., 2003)، که فلور میکروبی را از طریق جای گیری[1] یا کولونیزاسیون در بخشی از بدن میزبان

[1]. Implantation

تغییر داده و بدین ترتیب باعث اعمال اثرات مفید بر سلامتی میزبان می شود (Klaenhammer, 2000; Scherezenmeir & De verse, 2001).

اداره غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد(FAO) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) پروبیوتیک را این گونه تعریف می‌کنند: "پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف کافی آنها سبب نمایان شدن اثرات سلامت بخش در بدن میزبان می‌شود" (Almena et al., 2005).

بر این اساس، باکتری‌های پروبیوتیک موجود در محصولات خوراکی، نه تنها باید دارای مشخصه‌های عملکردی و سودمند برای سلامتی انسان باشند بلکه از قابلیت ماندگاری در دستگاه گوارش هم برخوردار باشند. بررسی بقای باکتری ها در سیستم گوارشی یکی از مهم ترین فاکتورها در انتخاب سویه پروبیوتیک است. ازین رو، بررسی بقای باکتری در سیستم گوارشی برای انتخاب باکتری پروبیوتیک الزامی است. مقاومت به اسید و صفرا، دو ویژگی اساسی برای تعیین توانایی باکتری برای عبور از دستگاه گوارش است (Morelli, 2000). بنابراین ارزیابی مقاومت به اسید و صفرا برای تعیین توانایی تحمل اسید معده و نمک های صفراوی روده صورت می گیرد (Gasson & De vos, 1994). پروبیوتیک‌ها همچنین قادرند اختلالات میکروبیولوژی روده، پس از درمان آنتی‌بیوتیکی را به حداقل برسانند.

از جمله مزایای غذاهای پروبیوتیک در سلامتی انسان می توان به مواردی از قبیل پیشگیری از اسهال، متعادل کردن میکرو فلور روده، ضد جوش، کاهش کلسترول، اصلاح عدم تحمل لاکتوز، بهبود سیستم ایمنی، پیشگیری از سرطان، پایین آوردن فشار خون، کاهش التهاب، کاهش نشانه های آلرژیک، مهار میکروارگانیسم های بیماریزا، پیشگیری از پوکی استخوان و پیشگیری از عفونت های ادراری- تناسلی اشاره نمود (Dugas et al., 1999; Du Toit ; Schrezenmeir & De Vrese, 2001 et al., 1998).

از میان میکروارگانیسم های پروبیوتیک، باکتری های اسید لاکتیک به عنوان مهم ترین گروه شناخته شده اند که در این میان جنس لاکتوباسیل به عنوان متداول ترین ارگانیسم های به کار رفته در تولید محصولات پروبیوتیکی مطرح می باشد (Klaenhammer, 2000).

۱-۲-۱- مهمترین جنس‌ها و گونه‌های پروبیوتیک

به طور کلی اغلب باکتریهای پروبیوتیک مورد استفاده در غذا، مکمل های غذایی و دارویی جزء باکتریهای اسید لاکتیک هستند و عمدتاً به دو جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم تعلق دارند.

۱-۲-۱-۱- جنس لاکتوباسیلوس

تاکنون ۵۹ گونه لاکتوباسیلوس[1] مورد شناسایی قرار گرفته است و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مهمترین گونه پروبیوتیک به شمار می آید. گونه‌های متعلق به جنس لاکتوباسیلوس در جدول (۱-۳) نشان داده شده است. لاکتوباسیلوس‌ها غیر اسپورزا، میله ای، گرم مثبت، کاتالاز منفی و معمولا نامتحرک[2] بوده و قادر به احیای نیترات نیستند (همایونی راد، ۱۳۸۷). در بدن حیوانات و انسان به عنوان فلور طبیعی زندگی می کنند و به نمک و پادزیست به طور نسبی مقاوم هستند (مرتضویان و سهراب وندی، ۱۳۸۵).

بر اساس الگوی تخمیر گلوکز به دو دسته همگون- تخمیر و ناهمگون- تخمیر قابل تقسیم هستند. دسته نخست گلوکز را از مسیر گلیکولیز[3] که شامل تبدیل گلوکز به دو مولکول پیرووات و سپس دو مولکول اسید لاکتیک همراه با ۲ATP است، تخمیر می کنند. در دسته دوم، تخمیر گلوکز از مسیر پنتوز- فسفات[4] است که در آن یک مولکول گلوکز به مولکول‌های لاکتات، CO_2، اتانول و ATP تبدیل می شود. آنزیم اساسی این مسیر، فسفوکتولاز[5] است که باعث آبکافت شدن زایلوز- ۵ -

---

[1] . Lactobacilli
2. Non- motile
3. Glycolytic pathway
4. Pentose- phosphate
5. Phosphoketolase

فسفات[1] به استیل کوآنزیم A[2]و گلیسرآلدئید-۳- فسفات[3] می شود. درمسیر پنتوز - فسفات، علاوه بر واکنش‌های یاد شده، در اثر تخمیر هر مول پنتوز، یک مول لاکتات و استات تولید می شود. انجام واکنش اخیر مشروط به وجود آنزیم فسفوکتولاز تحریک شونده[4] است. گونه‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کریسپاتوس، لاکتوباسیلوس گالیناروم، لاکتوباسیلوس گسری، لاکتوباسیلوس جانسونی یی، لاکتوباسیلوس هلویتیکوس، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس سالیواریوس زیرگونه سالیواریوس[5] از جمله انواع همگون –تخمیراختیاری[6] و گونه‌های لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس رئوتری از جمله انواع ناهمگون- تخمیر اجباری[7] به شمار می آیند.

باکتری هایی که به طور معمول در تهیه ماست استفاده می شوند (استارتر های تکنولوژیک) توانایی زنده رسیدن به محیط روده را ندارند و اثرات مفید آنها اصولاً به توده باکتریایی، ساخت آنزیم های خاص و تولید متابولیت های آنها مربوط می شود اما باکتری های پروبیوتیک (استارترهای درمانی) توانایی تحمل اسید معده و نمک های صفراوی و قابلیت جایگزینی در روده را دارند (Saxelin et al., 1999; Robinson, 1991).

مصرف مداوم و میزان مصرف این باکتری ها بر ایفای نقش های مفید درمانی آنها موثر است. دریافت روزانه $۱۰^{۸}$-$۱۰^{۹}$ باکتری زنده به عنوان حداقل تعداد قابل قبول مطرح شده است. بنابراین، مصرف روزانه ۱۰۰ گرم محصول پروبیوتیک دارای $۱*۱۰^{۶}$ تا $۵*۱۰^{۸}$ CFU باکتری های زنده در هر گرم فرآورده می تواند حد بهینه مورد نظر را تأمین کند (Dave & Shah ; Rybka & Kailasapathy, 1997).

1. Xylulose – 5- phosphate
2. Acetyl-CO-A
3. Glyceraldehyde- 3- phosphate
4. Inducible phosphoketolase
5. L. Salivarius ssp. Salivarius
6. Facultative heterofermentative
7. Obligatory heterofermentative

گونه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مهمترین و پرمصرف‌ترین گونه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس و به همراه بیفیدو باکتریوم، مهمترین ریز زنده پروبیوتیک به شمار می‌آید. این گونه فلور طبیعی روده کوچک انسان و حیوانات است. در روده کوچک در حضور کشش سطحی پایین ایجاد شده به وسیله نمک‌های صفراوی به خوبی رشد کرده و کلنی سازی می‌کند.

جدول ۱-۲- لیست مهمترین لاکتوباسیلوس‌های مربوط به انسان و حیوانات

گروه باکتریایی	نام ریززنده‌ها به فارسی	نام ریززنده‌ها به لاتین
باکتریهای اسیدلاکتیک جنس لاکتوباسیلوس	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	*L. acidophilus*
	لاکتوباسیلوس کازیی (آمیلووروس)	*L. casei (amylovorus)*
	لاکتوباسیلوس جانسونییی پاراکازایی)	*L. johnsonii (paracasei)*
	لاکتوباسیلوس کریسپاتوس	*L. crispatus*
	لاکتوباسیلوس گسری	*L. gasseri*
	لاکتوباسیلوس پلانتاروم	*L. plantarum*
	لاکتوباسیلوس رامنوسوس	*L. rhamnosus*
	لاکتوباسیلوس هلوتیکوس	*L. helviticus*
	لاکتوباسیلوس گالیناروم	*L. gallinarum*
	لاکتوباسیلوس سالیواریوس	*L. salivarius*
	لاکتوباسیلوس لاکتیس	*L. lactis*
	لاکتوباسیلوس لیچمانی یی	*L. Leichmanii*
	لاکتوباسیلوس سلوبیوسوس	*L. cellobiosus*
	لاکتوباسیلوس بولگاریکوس	*L. bulgaricus*

۱-۲-۱-۲- جنس بیفیدوباکتریوم

بیفیدوباکتریوم یکی از متداول ترین جنس های پروبیوتیکی شناخته شده است که امروزه تلاش های زیادی برای جداسازی این باکتری از منابع مختلف جهت استفاده در محصولات غذایی در حال انجام است (Bamforth, 2005; Francis, 2000).

به طور کلی در بیفیدوباکتریوم ها، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و بیفیدو باکتریوم لانگوم ثبات خوبی در طول فرآیند انبارداری دارند (Poutsiaka et al, 2017; Bergamini, 2005).

۱-۲-۲- خواص سلامت بخش پروبیوتیک‌ها

سودمندی های سلامت بخش پروبیوتیک‌ها ممکن است ناشی از فعالیت و حضور سلول‌های زنده آنها در سیستم گوارش، حضور سلول‌های مرده یا حتی تکه‌های دیواره سلولی و بخش‌های سیتوپلاسم، متابولیت‌های ترشح شده آنها در شیرابه گوارش و یا تمامی موارد یاد شده باشد. شاخص اساسی پروبیوتیک بودن، فعالیت و عمل سلول‌های زنده باکتری در داخل بدن است و از جمله مسایل مهم، پایداری باکتری های پروبیوتیک بکار رفته در محصول است به این دلیل که بقا و زنده ماندن این باکتری ها در طول مدت نگهداری فرآورده باید حفظ شود تا باکتری های پروبیوتیک بتوانند بیشترین تأثیرات مثبت خود را بر جای گذارند (Bomba et al., 1996; Arsov & Tokar,1999).

حفظ و افزایش پروبیوتیک (فلور میکروبی سودمند) در بخش‌های مختلف بدن به ویژه روده به منظور افزایش اثرات سودمند آنها به سه روش امکانپذیر است.

۱- دریافت تعداد زیاد سلول‌های زنده آنها به صورت مصرف خوراکی[1] یا کارگذاری موضعی[2] (استفاده از فرآورده های غذایی و دارویی).

۲- پرهیز از مجاورت با عواملی که جمعیت این باکتریها را در بدن کاهش می دهند (مانند رژیم ناسالم غذایی، تابش رادیواکتیو، تنش، بیماری و مصرف داروها و پادزیست ها).

1. Ingestion
2. Oral consumption

۳- مصرف مواد پری بیوتیک با رژیم غذایی، مصرف پری بیوتیک‌ها علاوه بر تحریک و تقویت رشد و فعالیت پروبیوتیک‌ها در بدن ممکن است مستقیما اثرات سودمند سلامت بخش نیز به همراه داشته باشد. برای مثال گزارش شده است که مصرف نئو شوگر (نوعی فروکتو-الیگوساکارید) ضمن افزایش تعداد بیفیدوباکتریوم‌ها در روده، فعالیت آنزیم‌های مضر روده ای را نیز کاهش می دهد (Gibson & Rabiford, 1995)، نتیجه این خاصیت کاهش ریسک سرطان زایی است.

پری بیوتیک ها ترکیبات غذایی غیر قابل هضمی هستند که با تحریک انتخابی، رشد یا فعالیت یک یا تعداد محدودی از باکتری ها در روده، اثرات مفیدی را در میزبان بر جای می گذارند (Guarner, 2008). این ترکیبات به عنوان فاکتور دوم جهت کنترل فلور میکروبی روده بعد از پروبیوتیک ها در نظر گرفته می شوند (Cittenden et al., 2002).

از نتایج بکارگیری پری بیوتیک ها در فرآورده های غذایی می توان به مواردی از قبیل افزایش قابلیت زیستی، تحریک رشد و فعالیت پروبیوتیک ها (Stanton et al., 2005; Cumminges et al., 2004)، ایجاد بافت خامه ای (Tamime, 2005)، بهبود بافت فرآورده (Shortt, 2004)، بهبود و افزایش احساس دهانی (Pereira & Gibson, 2002) و افزایش تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه (Cai, 2007) اشاره کرد.

پروبیوتیک ها در کاهش میزان کلسترول، فعالیت ضد میکروبی بر علیه پاتوژن ها، ایجاد تعادل مطلوب در میکروفلور طبیعی و کاهش عدم تحمل لاکتوز و بسیاری عملکردهای دیگر نقش بارزی دارد (Bomba et al.,1996; Collins et al., 1998; Alphy et al., 2009). چرا که کلسترول اعمال متنوعی از جمله ساختن غشاء پلاسمایی، هورمون های استروئیدی، تشکیل نمک های صفراوی و تکامل جنینی اهمیت دارد به همین دلیل افزایش آن بسیار مضر بوده و در سلول ها ایجاد کریستال های جامد می کند که موجب مرگ سلول می شود و افزایش آن در خون سبب آترو اسکلروز و بیماری

های قلبی – عروقی می شود و افزایش آن در صفرا ایجاد سنگ های صفراوی می کند (Piri & Oryan, 2004).

بنابراین بکارگیری این میکروارگانیسم ها در فرآورده های لبنی همچون ماست می تواند محصولی با ارزش غذایی و کیفیت بالا ایجاد کند. امید است با تولید چنین فرآورده هایی بتوان تحول مثبتی در جهت تغذیه و سلامتی افراد ایجاد نمود (عریان و همکاران، ۱۳۸۹).

۱-۲-۳- معرفی برخی متابولیتهای ارزشمند پروبیوتیک ها

یکی از مهمترین کاربردهای بیوتکنولوژی در صنایع غذایی تولید مواد افزودنی مختلف می باشد از جمله مواد افزودنی که به روش بیوتکنولوژی تولید می شوند می توان به پلی ساکارید های میکروبی مختلف مانند **اگزو پلی ساکاریدهای** (EPS) تولید شده به وسیله باکتری های اسید لاکتیکی در محصولات لبنی اشاره کرد (طیب لقمانی و همکاران، ۱۳۹۲).

اگزو پلی ساکاریدها پلیمرهایی با زنجیره بلند و وزن مولکولی بالا هستند که از واحدهای قندی تشکیل شده اند و توسط میکروارگانیسم ها به محیط اطراف ترشح می شوند (خدابخش و همکاران، ۱۳۹۱؛ ظفر مختاریان و همکاران، ۱۳۹۷).

اگزو پلی ساکارید ها شامل دو گروه مهم هترو و همو پلی ساکارید هستند. هترو پلی ساکاریدها در ساختمان خود بیش از یک نوع قند منومری دارند و در داخل سلول از قند نوکلئوتید سنتز می شوند. همو پلی ساکاریدها از یک قند منومری (D گلوکز یا D فروکتوز) تشکیل شده و در محیط خارج سلول سنتز می شوند (De vuyst et al., 2001; Monsan et al., 2001).

همو پلی ساکاریدهای تولید شده توسط لاکتوباسیلوس ها در دو گروه گلوکان ها و فروکتان ها طبقه بندی می شوند. هترو پلی ساکاریدها متشکل از انواع مختلف مونو ساکارید می باشند که گاهی ترکیبات غیر کربوهیدراتی مانند سولفات ها و یا استات ها در زنجیر پلی ساکاریدی یافت می شوند (Baruah et al., 2016; Monsan et al., 2001). این ترکیبات در آب حل شده و یا پخش می گردند و باعث ژله ای شدن و قوام مواد غذایی (قمری، ۱۳۸۸) یا سبب حفاظت سلول ترشح کننده در مقابل

خشک شدن، فاگوسیتوز، آنتی بیوتیک ها و ... می شوند. این نوع از باکتری ها با سنتز (EPS) و ایجاد فلور میکروبی سودمند روده ای پروبیوتیک قادر به تولید محصولات فرا سودمند با قابلیت نگهداری بالا و عطر و طعم و بافت مناسب می باشد (طیب لقمانی و همکاران، ۱۳۹۲). از طرف دیگر اگزو پلی ساکاریدهای حاصل از باکتری های اسید لاکتیک اثر ضد توموری دارند. همچنین این ترکیبات سیستم ایمنی را تحریک کرده و کلسترول خون را کاهش می دهند. بنابراین اگزو پلی ساکاریدهای حاصل از باکتری های اسید لاکتیک این پتانسیل را دارند تا به عنوان افزودنی های غذایی با اثرات سلامتی بخش مورد استفاده قرار گیرد. اگزو پلی ساکاریدهای تولید شده توسط لاکتوباسیلوس ها، در صنعت غذا به عنوان قوام دهنده، ویسکوز کننده، پایدار کننده، امولسیون کننده یا بافت دهنده به کار می روند (خدابخش و همکاران، ۱۳۹۱).

از کاربردهای دیگر این ماده علاوه بر اثر امولسیفایری و پایدار کنندگی سوسپانسیون، به کنترل کریستالیزاسیون، ممانعت از سینرسیس، انکپسولاسیون، تشکیل فیلم و بهبود کیفیت در پنیر می توان اشاره کرد.

اگزو پلی ساکاریدها از لحاظ نوع ارگانیسم تولید کننده به دو دسته تقسیم می شوند که شامل اگزو پلی ساکاریدهای تولیدی به وسیله باکتری های اسید لاکتیک و اگزو پلی ساکاریدهای تولیدی به وسیله سایر میکرو ارگانیسم هاست. تولید اگزو پلی ساکاریدها از باکتری های اسید لاکتیک در سال های اخیر بدلیل نقش آنها در رئولوژی و بافت مواد غذایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است (قمری، ۱۳۸۸).

از دیگر متابولیتهای باکتری های اسید لاکتیک **گاما آمینو بوتیریک اسید** (GABA) می باشد.

گاما آمینو بوتیریک اسید یک اسید آمینه چهار کربنه غیر پروتئینی است که اولین بار در سال ۱۸۸۳ سنتز شد (Kheiri et al., 2012). به طور گسترده ای در میان موجودات یافت شده و سنتز آن توسط آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز طی واکنش دکربوکسیلاسیون غیر قابل برگشت ال گلوتامات انجام

می شود و نیازمند کوفاکتور پیریدوکسال فسفات است (Kim et al., 2009; Mazur et al., 2011; Hiraga et al., 2008).

میزان تولید GABA عمدتاً به خواص بیوشیمیایی آنزیم مرتبط می باشد. کاهش فشار خون، درمان بی خوابی، افسردگی و اثرات ادرار آور از جمله عملکردهای فیزیولوژیکی مهم گاما آمینو بوتیریک اسید است. تعدادی از باکتری ها، قارچ ها و مخمرها قادر به تولید مقادیر قابل توجه GABA می باشند. از بین باکتری ها، باکتری های اسید لاکتیک بسیار مورد توجه می باشند. زیرا از نظر فیزیولوژی خاص و به طور کلی ایمن می باشند. همچنین به طور گسترده در صنایع غذایی استفاده می شوند و به عنوان پروبیوتیک در دستگاه گوارش عمل می کنند.

تعدادی از عملکردهای مهم GABA شامل کاهش فشار خون در انسان و حیوانات آزمایشگاهی (Li & Cao., 2010; Mazur, et al., 2011; Lin, et al., 2009)، اثرات ادرار آور (Kheiri, et al., 2012; Siragusa, 2007)، اثرات آرام بخش، درمان بی خوابی، افسردگی (Esmaeili, et al., 2009)، بیماری های خود ایمنی (oh & oh, 2003)، درمان بیماری های مزمن مربوط به مصرف الکل (Oh, et al., 2003)، کاهش التهاب (Hayakawa, et al., 2004)، محرک سلول های ایمنی (oh & oh, 2003)، مهار دیابت (Taneera, et al., 2012; Yan, et al., 2008)، خواص ضد توموری (Wu, et al., 2012) انتشار اسیدهای آمینه آزاد، بهبود سلامت اعصاب و روان انسان (Parvez,et al., 2006)، درمان ناهنجاری های نورولوژیکی مثل صرع، پارکینسون، شیزوفرنی، اسپاسم و الزایمر (Esmaili & Ghaedi, 2010)، بهبود غلظت پلاسمایی هورمون رشد و افزایش سنتز پروتئین در مغز (Komatsuzaki, et al., 2005) است. علاوه بر مفید بودن GABA برای انسان ها، این اسید آمینه تحمل نسبت به تغییرات pH و با تولید ATP برای خود باکتری نیز مفید است.

با توجه به این که GABA یک ماده سودمند در صنایع غذایی و دارویی است، در نتیجه توسعه غذاهای حاوی GABA بسیار مورد توجه و پیگیری است (Higuchi et al., 1997; Small & Waterman, 1998). غنی سازی GABA تا به حال در غذاهای مختلفی با استفاده از افزودن باکتری

های پروبیوتیک انجام شده است از جمله جوانه برنج خیسانده شده در آب، جوانه برنج تخمیر شده با جلبک قرمز، چای سبز تخمیری و فرآورده های لبنی (Siragusa et al., 2007; Komatsuzaki et al., 2005).

اخیراً تعدادی از گونه ها و زیر گونه های باکتری های اسید لاکتیک گزارش شده اند که توانایی تولید مقادیر متفاوتی از GABA را دارند. این ها شامل لاکتوباسیلوس برویس (Li et al.,2008;Siragusa et al., 2007;Kim et al., 2009; Gardner et al., 2001; Yokoyama et al., 2002; Kim et al., 2007)، لاکتوکوس لاکتیس (Siragusa et al., 2007; Lu et al., 2009;Nomura et al., 1999)، لاکتوباسیلوس پاراکازئی (Kelley et al., 2008; Rossetti & Lombord., 1996)، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس (Siragusa et al., 2007; Taherzadeh et al., 2013)، لاکتوباسیلوس بوشنری (Cho et al., 2007; Park & Oh, 2006)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم (Siragusa et al., 2007)، لاکتوباسیلوس هلوتیکوس (Sun et al., 2009) و استرپتوکوکوس سالیواریوس زیر گونه ترموفیلوس (Yang et al., 2006) است. در این میان لاکتوباسیلوس برویس دارای بالاترین میزان تولید GABA است (Nomura et al., 1998) و در میان باکتری های اسید لاکتیک لاکتوباسیلوس ها دارای بالاترین میزان تولید می باشند (طاهر زاده و همکاران، ۲۰۱۳).

دیگر متابولیت که به سبب ویژگی های سودمند در صنایع پزشکی و دارویی در منابع مختلف باکتریایی مورد مطالعه قرار می گیرد **ε - پلی ال لایزین** [1] می باشد. مقاومت چند دارویی یک مشکل وسیع جهانی است که به استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها مربوط می شود. فشار انتخاب گونه های باکتریایی و فقدان داروهای جدید، واکسن ها و کمک های تشخیصی از جمله این مشکلات است. این کمبود ها منجر به فراخوان فوری جهانی برای داروهای ضد میکروبی جدید علی الخصوص از منابع طبیعی گردید (Sundaram, et al., 2011). عوامل آنتی میکروبی (ضد میکروبی) تولید شده به وسیله

[1] Epsilon poly-l-lysine

باکتری های گرم مثبت بدلیل پتانسیل کاربردی به عنوان افزودنی های غذایی مـورد توجـه بیشـتری است. پلی ال لایزین یک پلی پپتید کاتیونی مشتق از اسید آمینه لایزین است (صمدی، ۱۳۹۷).

ε- پلی ال لایزین (ε- PL) یک هموپلیمر اساسی است که فعالیت ضـد میکروبـی قـوی بـر علیـه اکثریت باکتری های گرم مثبت و گرم منفی، قارچ ها و همچنین برخی از انواع ویروس هـا دارد (El- Sarsy, et al., 2010).

مکانیسم بازدارندگی بر اساس جذب الکتروستاتیک بر سطح سلول باکتری و خاصیت کـاتیونی آن است که موجب چروکیدگی غشاء بیرونی سلول و توزیع غیر عادی سیتوپلاسم می شود. ایـن ترکیـب طبیعی، محلول در آب، مقاوم به دماهای بالا، زیست تخریب پذیر، خوراکی، غیر سمی برای انسان ها و محیط زیست می باشد (صمدی، ۱۳۹۷).

علاوه بر این، اثر ضد تومور دارد. به این ترتیب، به طور گسترده ای در تولید مواد غذایی به عنـوان نگهدارنده ایمن مورد استفاده قرار گرفته است. شرایط محیطی و تغذیـه ای تـأثیر بالـایی روی تولیـد عوامل ضد میکروبی به منظور دستیابی به حداکثر تولید دارد. دانش مربوط به عوامل محیطی موثر بر این فرآیند به خوبی شناخته شده نیستند (El- Sarsy, et al., 2010).

در تحقیقاتی که تاکنون انجام شده نشان داده است که ε - پلـی ال لـایزین حاصـل از باسـیلوس سابتیلیس اثر منفی بر روی تمامی باکتری های گرم منفی آزمایش شده با درجه های تنوع وابسته به گونه های باکتریایی داشته است. البته اثـر منفـی روی رشـد اسـتافیلوکوکوس اورئـوس گـرم مثبـت مشاهده نشده است. فعالیت ضد سرطانی بواسطه تست اولیه ابتلا به سمیت محیط کشت صاف شده و ارزیابی فعالیت در برابر سه نوع سلول مختلف سرطانی دهانه رحم، سلول های سرطانی کبدی و سلول های سرطانی روده بزرگ صورت گرفت که نشان داد ε - پلی ال لایزین به طـور بـالقوه تکثیـر سـلول های سرطانی $Hela\ S_3$ را با غلظت کشنده LC71 و سلول های $Hep\ G_2$ را بـا غلظـت کشـنده LC53 مهار می کند. این نتایج این امکان را فراهم می آورد که این متابولیت در پیـدا کـردن یـک جـایگزین

برای درمان سرطان کمک کند و به عنوان یک داروی شیمی درمانی استفاده شود (Nermeen, et al., 2012). شلیاخونکو[1] و همکاران نیز به همین نتـایج دسـت یافتنـد (Shlyakhovenko, et al., 2003). اخیراً پلی ال لایزین به عنوان نگهدارنده غذایی، عامل امولسیفیه کننده و عامل رژیمی نیز کاربرد دارد (صمدی، ۱۳۹۷).

با توجه به این که پژوهش حاضر بر روی فرآورده های لبنی نظیر ماست، پنیر، کره، دوغ و کشـک صورت گرفت در بخش بعد مختصری به تاریخچه و تکنولوژی آن ها پرداختیم:

۱-۳- آشنایی با فرآورده های لبنی

فرآورده های لبنی از جمله مواد غذایی هستند که باکتری های اسید لاکتیک در آن زندگی می کنند. بشر سال هاست برای تغییر خصوصیات طعم و بافت محصولات لبنی به منظور افزایش زمان ماندگاری آن ها از این باکتری ها استفاده می کند (Rossart & Luquet, 1994). نقش اولیـه ی بـاکتری هـای اسید لاکتیک تخمیر کربوهیدرات ها و به دنبـال آن کـاهش pH محصـولات لبنـی اسـت. وجـود pH اسیدی به دلیل تولید اسید های آلـی بخصـوص، اسـید لاکتیـک، دی اسـتیل، پراکسـید هیـدروژن و باکتریوسین های متعدد از جمله عوامل اصلی حفظ خواص مفید فرآورده های لبنی است (Oyetayo et al., 2004).

افزودن باکتری های اسید لاکتیک به مواد غذایی روز به روز در حال افزایش است به طوری که تقاضا برای مصرف مواد غذایی بخصوص مواد لبنی حاوی باکتری های مفید به طور چشمگیری افزایش یافته است. از این رو، جستجوی گونه های جدیدی از باکتری های مفید اسید لاکتیک از منابع مختلف برای بهره برداری در تغذیه انسان بسـیار حـائز اهمیـت اسـت (Carminate et al.,2014; Quigley et al., 2013).

[1]Shlyakhovenko

۱-۳-۱- ماست:

۱-۳-۱-۱- تعریف و تاریخچه

امروزه به کمک انواع مکانیسم های طبیعی اما پیچیده مواد غذایی فراوان، مغذی، خوش طعم و قابل نگهداری برای مدت زیاد در بسیاری نقاط جهان بدست می آید. از جمله شیرهای تخمیر شده یا فرآورده هایی از شیر که به کمک میکروارگانیسم ها در آن اسید لاکتیک و دیگر ترکیبات تولید می شود که در بعضی از کشورهای اروپای مرکزی، اطراف مدیترانه، آسیا و آفریقا این محصولات مهم تر از شیر تازه هستند (کوزیکوسکی، ۱۳۷۴).

یکی از فرآورده های تخمیری شیر ماست می باشد. مبدأ اولیه ماست شبه جزیره بالکان و خاورمیانه است و برای جوامعی که در این قسمت ها زندگی می کردند، این شکل از فرآورده تخمیر شده شیر به عنوان ماست طبیعی غیر شیرین و بدون نمک شناخته می شد. علیرغم نزدیکی اروپا به خاورمیانه تا سال ۱۹۶۰ که صنعت ماست در سوئیس گسترش زیادی داشت این محصول عمومیت نیافته بود و از این زمان به بعد شهرت ماست تا دیگر نقاط منتشر شد و مصرف آن به صورت مناسبی افزایش یافت (Anonymous,1998؛ نواب پور و شهبازلو، ۱۳۷۴).

ماست در مجموع پر مصرف ترین فرآورده تخمیری شیر در جهان است. هر چند در گذشته ماندگاری بیشتر آن نسبت به شیر مورد توجه بوده، امروزه اساساً به سبب خواص حسی ویژه ای که برخوردار است مصرف می شود (ISIRI. Standard No. 695, 2012).

این فرآورده از لحاظ تغذیه ای به سادگی هضم می شود. دارای ارزش غذایی بالایی بوده و منبع غنی از کربوهیدرات، پروتئین، چربی، ویتامین ها، کلسیم و فسفر می باشد. بدلیل ترکیبات پروتئین، چربی و لاکتوز که به طور جزئی طی فرآیند تخمیر تجزیه می شوند ماست یک فرآورده سهل الهضم تر از شیر می باشد. ماست قادر است فلور میکروبی دستگاه گوارش را حفظ نماید و حالت ضد تومور و ضد کلسترول را دارا باشد. (zobkova,1979; orlajensen,1993; con and cakmakci,1996; سعادت نوری، ۱۳۶۳).

ماست پاره ای خواص درمانی نیز از جمله به سبب تخمیری بودن در بر دارد، به طوری که از دوران قدیم برای بعضی بیماری ها و مسمومیت ها تجویز شده است. مچنیکوف در سال ۱۹۰۷ برمبنای فرضیه ای سلامت و طول عمر بالای کشاورزان و دامداران بلغار را به مصرف زیاد و مداوم ماست در طول زندگی نسبت داد. تا دهه ۱۹۵۰ تولید و مصرف ماست به صورت جهانی درنیامده بود و بیشتر به خاورمیانه، جزایر بالکان، هند و اروپای شرقی و اقوام پراکنده محدود می شد. به تدریج این روند با سرعت بالا به سوی جهانی شدن تغییر کرد (ISIRI. Standard No. 695, 2012).

سابقه مصرف ماست، شیر ترش شده در خاورمیانه به هزاران سال قبل می رسد و در فرهنگ مردم برای آن خواص درمانی قائلند به طوری که مچنیکوف - بیولوژیست مشهور- حدود ۱۰۰ سال قبل معتقد شد که مصرف ماست با سرکوب کردن فلور میکروبی پاتوژن دستگاه گوارش و اسیدی کردن محیط باعث می شود که مواد غذایی کمتر دچار گندیدگی شده و لذا باعث سلامتی و افزایش طول عمر می شود (رحمانی، ۱۳۸۰).

بعد از او طبق تحقیقات متعددی معلوم شده که این فرآورده بر روی سرطان، بیماری های آلرژیک و عفونت های روده ای تأثیر درمانی دارد (Kopp & Hoolihan, 2001) و بخاطر این که افزایش شیوع بیماری های آتوپیک (حساسیت آلرژیک) در سالهای اخیر به یک معضل بهداشتی جدی در جوامع تبدیل شده است لذا توجه محققین به سوی این فرآورده معطوف شده است (Crane, 2002). به نظر می رسد این عوامل محیطی هستند که در صورت وجود زمینه ژنتیک مساعد می توانند باعث ایجاد بستر آتوپی در فرد شده و متعاقباً امکان ابتلا او را به بیماری های آلرژیک سبب گردند (Holt, 2000) و در میان عوامل محیطی احتمالاً فاکتورهایی که در اوان طفولیت تکامل سیستم ایمنی را شکل می دهند نقش کلیدی دارند (Strachan, 2000).

در همین راستا، تحقیقات چند سال اخیر نشان می دهد که مصرف ماست بخصوص در جوندگان با افزایش تولید انتروفرون گاما و فاکتور رشد و مبدل بتا (TGF-β) همراه بوده که مبین همین مطالب

ذکر شده می باشند (Water, et al., 1999; Murch, 2001) و باعث تکامل طبیعی سیستم ایمنی و نوعی تولرنس نسبی نسبت به آلرژن ها می گردد (Murch, 2001).

۱-۳-۱-۲- انواع ماست

ماست از نقطه نظرات مختلفی قابل دسته بندی است :

_ ژلی بودن بافت: از این دیدگاه، ماست به دو دسته قالبی و ماست هم زده تقسیم می‌شود. در تولید ماست قالبی مراحل ژل بندی (گرم خانه گذاری و تخمیر) و متعاقب آن سرد کردن در ظروف بسته بندی انجام می‌شود (بافت ماست قالب ظرف را به خود می‌گیرد). حال آنکه در تولید نوع دیگر ماست، ابتدا مراحل تخمیر و هم زنی ژل در مخزن تخمیر انجام شده و سپس بسته بندی صورت می‌گیرد. ماست قالبی از نظر بافت شناختی برخلاف ماست هم زده، دارای ساختار ژل است.

_ گرما دیدن ماست پس از تخمیر: از این نظر، ماست در دو دسته ماست گرما دیده و ماست گرما ندیده طبقه بندی می‌شود. گرما دهی پس از دوره تخمیر به منظور غیر فعال کردن میکروارگانیسم‌های آغازگر و از بین بردن آلودگی‌های ثانویه احتمالی و در نتیجه آن افزایش مدت زمان ماندگاری ماست صورت می‌گیرد.

_ مقدار چربی و درصد ماده خشک: از نظر چربی ماست به انواع ماست بدون چربی، ماست کم چرب، ماست نیم چرب، ماست پر چرب و ماست خامه‌ای تقسیم می‌شود. از دیدگاه درصد ماده خشک ماست، این فرآورده به دو نوع چکیده و غیر چکیده تقسیم می‌شود. چکیده کردن ماست با یکی از روش‌های آب زدایی (همچون سانتریفوژ کردن، تبخیر کردن و صاف کردن غشایی) یا ترکیبی از روش‌ها انجام می‌شود. به طور کلی بر مبنای مقدار چربی و درصد ماده خشک، انواع ماست به شرح زیر طبقه بندی می‌شود:

- ماست بدون چربی، ماست کم چرب، ماست نیم چرب، ماست پر چرب، ماست خامه ای، ماست هم زده بدون چربی، ماست هم زده کم چرب، ماست هم زده نیم چرب، ماست هم زده پر چرب، ماست

هم زده خامه ای، ماست چکیده کم چرب، ماست چکیده نیم چرب، ماست چکیده پـر چـرب، ماسـت چکیده خامه ای(ISIRI. Standard No. 695, 2012).

در اشکال تجاری ماست از شیر کامل تهیه می شود و می توان آن را با پروتئین هایی مثل پودر شـیر پس چرخ تکمیل نمود. اضافه کردن پروتئین باعث کمک بـه تشـکیل سـاختار پـروتئین- ژل در ایـن فرآورده می شود. این مواد خام قبل از مایه زنی، حرارت دیده و سپس سرد می شـوند، حـرارت دادن یک امر ضروری است چون در غیر این صورت در اثر انعقاد بعدی پروتئین ژل یکنـواختی تولیـد نمـی شـود. مایـه زنـی از طریـق افـزودن اسـتارتر مخلـوطی از سـویه هـای ترموفیـل *Streptococcus thermophiles*، *Lactobacillus delbruckii* زیر گونه *bulgaricus* به نسبت ۱:۱ صورت مـی گیـرد. ماست حاصل تخمیر لاکتیکی این دو آغازگر است. استرپتوکوکوس ترموفیلوس عمدتاً تولید اسید مـی نماید در حالی که لاکتوباسیلوس بولگاریکوس بیشتر ترکیبات ارگانولپتیک (حسی) بخصوص استالدئید تولید می کند. آنزیم های پروتئولیتیک و پلیمرهای خارج سلولی این استارتر نیز به تشـکیل سـاختار پروتئین - ژل کمک می نماید. ماست را می توان برای افزایش دوره ی نگهداری پاستوریزه نمود یا به همان صورت میکروب های زنده را مصرف کرد که در این صورت ماسـت دارای خاصـیت پروبیوتیـک است. این فرآورده در شکل سنتی (بدون پاستوریزه) به عنوان معروف ترین حامل میکروارگانیسم های پروبیوتیک و عامل انتقال آن به مصرف کننده شناخته شـده اسـت (Zacharchenco & Massargur-Rosing, 2006).

پروبیوتیک ها به عنوان میکروارگانیسم های زنده ای که در مقادیر کافی مزایای سلامتی بخش بر روی میزبان می گذارند، معرفی شده اند (Stanton et al., 2005; Almena et al.,2005). در بخش آخر این فصل توضیحات بیشتری در خصوص این دسته از میکروارگانیسم ها داده شده است.

۱-۳-۲- پنیر:

پنیر نام عمومی بخشی از فرآورده های شیری است که با تغییر در اجزای کازئین شیر تولید و سـاخته می شود. همراه کازئین بخشی از پروتئین های آب پنیر، چربی ها و دیگر مواد مغـذی شـیر در لختـه

باقی می ماند. هدف اصلی از تولید پنیر، نگهداری مواد مفید شیر در شرایط فاسد شدنی، با حفظ مـزه مطلوب و بدون کاهش ارزش غذایی موجود در آن است. به منظور ایجاد کیفیت مطلوب، ضروری است شیر استفاده شده در پنیر سازی، دارای بالاترین کیفیت باکتریولوژی و شیمیایی باشد.

ضرورت های استاندارد برای شیر با کیفیت بالا:

- تعداد اولیه باکتری در شیر کم باشد.
- در شیر هیچ گونه باکتری بیماریزا نباشد.
- شیر دارای توانایی مناسب برای رشد باکتری های آغازگر باشد.
- شرایط شیر برای فعالیت آنزیم مایه پنیر مناسب باشد.
- ترکیبات موجود در شیر طبیعی باشد.
- بو و مزه شیر حالت طبیعی داشته باشد.
- تعداد باکتری های اسید بوتیریک در شیر بسیار کم باشد (فرهنودی، ۱۳۸۲).

حجم تولید جهانی پنیر که امروزه بیش از 10^{10} کیلوگرم در سال می باشد، از $5*10^{10}$ لیتر شیر گـاو به دست می آید. تولید پنیر مستلزم تغلیظ چربی شیر و پروتئین از طریـق حـذف آب آن مـی باشـد. البته، انواع بسیار متفاوتی از پنیرها با بافت و طعم های بسیار متنوع وجود دارد. محدوده بافـت هـا از نرم تا بسیار سخت و طعم از ملایم تا بسیار قوی تغییر می کند. این محدوده وسیع بدلیل تفاوت های ذیل می باشد:

۱) نوع شیر مصرفی ۲) رژیم غذایی دام شیرده ۳) سویه خاص میکروارگانیسم کـه جهـت مایـه زنی در مراحل مختلف تولید، از جمله مراحل افزودن استارتر و مرحلـه رسـانیدن بـه کـار مـی رود و خواص مختلف ارگانولپتیک (حسی) را ایجـاد نمـوده و بافـت پنیـر را اصـلاح مـی کنـد. ۴) روش فرآوری به کار گرفته شده ۵) شرایط محیطی بخصوص درجه حرارت و رطوبت در طی رسیدن.

هیچ نوع روش استانداردی برای تولید پنیر وجود ندارد زیرا تنوع بسیار زیادی در مراحل مختلف فرآوری موجود است و مقادیر زیادی از پنیرها نیز هنوز بدون استفاده از مبانی علمی تولید می شوند. البته برای اکثر پنیرها فرآیند عمده شامل موارد زیر است:

۱) تیمار اولیه شیر خام ۲) تشکیل دلمه جامد ۳) خروج آب پنیر مایع از دلمه ۴) فرآوری دلمه ۵) مرحله رسانیدن.

در آغاز، شیر تازه از نظر خصوصیات شیمیایی و میکروبی کنترل شده و سپس پاستوریزه می گردد. ایجاد پروتئین های منعقد شده شیر یا دلمه از طریق فعالیت باکتری های اسید لاکتیک مثل لاکتوکوکوس لاکتیس، لاکتوکوکوس کرموریس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس صورت می گیرد. این باکتری ها از طریق تخمیر لاکتوز به اسید لاکتیک، pH را کاهش داده و بدین ترتیب انعقاد پروتئین را آسان می سازند. این باکتریها با تولید ترکیبات عطر و طعم زای خاص، طعم فرآورده نهایی را نیز تحت تأثیر قرار می دهند و باعث پروتئولیز و لیپولیز در مراحل بعدی رسیدگی پنیر می شوند. عمل رسانیدن باعث تغییر پروتئین ها و چربی ها می شود (مرتضوی و کوچکی، ۱۳۸۳).

۱-۳-۳- کره

طبق تعریف کمیسیون غذایی کدکس در سال ۱۹۷۳، کره فرآورده چربی است که فقط از شیر به دست می آید. هدف از کره زنی تبدیل امولسیون چربی در آب (خامه) به امولسیون آب در چربی (کره) است. فرآیند تولید کره به دو روش سنتی و صنعتی انجام می شود. روش صنعتی نیز به دو بخش مداوم و غیر مداوم تقسیم شده که روش مداوم متداول تر است. در این روش خامه در جدا کننده (سپراتور) از شیر کامل جدا می شود. خامه جدا شده حاوی ۳۰ تا ۴۰٪ چربی است. چنانچه هدف تولید کره لاکتیکی باشد از مخلوط آغازگرهای استرپتوکوکوس کرموریس. لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه دی استی لاکتیس و لوکونوستوکها استفاده می شود. در این مرحله خامه به pH ۵/۵ = در ۱۲ درجه سلسیوس و سپس به pH = ۴/۶ در ۱۳ درجه سلسیوس می رسد. بیشترین تولید عطر و طعم در pH=۴/۵ - ۵/۵ صورت می گیرد. در صورت تولید کره شیرین از خامه شیرین (بدون

آغازگر) استفاده می شود. درمخزن رسیدگی[1] به خامه برنامه خنک شدن کنترل شده [2] داده می شود تا چربی به ساختار کریستالی مورد نظر برسد. دوره رسیدگی مدت زمان ۱۲-۱۵ ساعت است. خامه از مخزن رسیدگی به دستگاه کره زنی (چرن[3]) پمپ می شود. در چرن گلبول های چربی خامه شکسته شده و به شکل لایه های بسیار نازک در می آید و سطح آن به میزان قابل توجهی افزایش می یابد. بافت کره یکنواخت شده و چربی باقی مانده در دوغ آب کره کاهش می یابد. در آخر، دوغ آب کره از چرن خارج می شود. در تولید کره نمکی، آب نمک به منظور بهبود طعم (بیشینه به مقدار ۲٪) بداخل چرن افزوده می شود. بدین ترتیب نمک در فاز آبی حل شده و مالش دادن کره در چرن ادامه می یابد. در هنگام مالش کره، چربی گلبولی به چربی آزاد تبدیل می شود و سایز قطرات آب کوچکتر شده و قابل رویت نخواهد بود. سپس کره از چرن تخلیه شده و وارد دستگاه بسته بندی شده و از آن جا به سردخانه منتقل می شود (استاندارد ملی ایران، شماره ۱۶۲).

۱-۳-۴- دوغ[4]

نوشیدنی های لاکتیک[5] فرآورده هایی هستند که روند تولید آنها شامل تخمیر شیر بوسیله باکتری های اسید لاکتیک و سپس رقیق سازی لخته حاصل با آب، آب پنیر و یا تراویده شیر[6] است که با توجه به تقاضای بازار، با استفاده از افزودنی هایی مثل شکر، نمک، پالپ یا آبمیوه به فرمولاسیون مطلوب می رسند (Laurent & Boulenguer, 2003). نوشیدنی های آب پنیر، ماست نوشیدنی[7]، آیران[8] و دوغ نمونه هایی از این محصولات هستند (Institute of Standards and Industrial Research of Iran,11324).

---

[1] Ripening
[2] Controlled Cooling
[3] Churn
[4] Doogh
[5] Lactic Beverages
[6] Permeate
[7] Yogurt Drink
[8] Ayran

دوغ از نوشیدنی های سنتی ویژه ایران است. این فرآورده یا فرآورده هـای مشـابه آن، پـس از ایـران در افغانستان، آذربایجان، ارمنستان، عراق، سوریه، بلغارستان، ترکیه، جزایر بالکان و به مقدار کمتر در سایر کشورهای خاورمیانه و آسیای مرکزی به مصرف می رسند. برای مثال، آیرن که ویژگی های حسی (بـه ویژه خواص ظاهری و بافتی) نسبتاً مشابهی با دوغ دارد نوشیدنی ویژه ترکیه به شمار می آید.

در گذشته " دوغ " به فرآورده ای اطلاق می شـد کـه پـس از رقیـق سـازی ماسـت پرچـرب بـا آب و جداسازی چربی آن با استفاده از مشک بر جای می ماند. امروز دوغ از ویژگی های مشخص و استاندارد شده فیزیکی، شیمیایی، فیزیکو شیمیایی، میکروبی (از دیـدگاه سـنجش ابـزاری) و حسـی (از دیـدگاه ارزیابی حسی) برخوردار است.

در حال حاضر دوغ از مقبولیت و مصرف بالا در ایران برخـوردار اسـت و میـزان مصـرف سـرانه و تولیـد صنعتی آن در سالهای اخیر رشد قابل توجهی داشته است. مقبولیت دوغ نه تنها، به عنوان فرآورده ای با ویژگی های حسی مطلوب، بلکه به عنوان نوشیدنی تخمیری سالم و سلامت بخش سبب شده اسـت بـه عنوان نوشیدنی ملی ایران پذیرفته شود.

از خواص تغذیه ای دوغ می توان به افزایش ویتامین ها و متابولیت های مغذی، بهبود جـذب کلسـیم و قابلیت هضم بیشتر نسبت به شیر اولیه اشاره کرد. در دهه اخیـر در راسـتای سیاسـت هـای تغذیـه ای دولت مبنی بر جایگزینی دوغ بجای نوشابه های گازدار صنعتی، تولید صنعتی دوغ رواج یافته و تـا حـد زیادی با استقبال مردم رو به رو شده است تا آنجا که طبق آمار منتشره از سوی جهاد کشاورزی میـزان تولید دوغ در ایران در سال های اخیر روند افزایشی داشته است و مصرف آن حدود ۴۰٪ افـزایش پیـدا کرده است (وثوق و همکاران، ۱۳۸۸).

۱-۳-۴-۱- طبقه بندی دوغ:

دوغ ساده از نقطه نظرات گوناگونی به شرح زیر قابل بسته بندی است:

۱) گازدار بودن: از این نقطه نظر دوغ بر دو نوع است: دوغ گازدار و دوغ بدون گاز.

منظور از دوغ گاز دار، دوغ کربناته است. استفاده از هر نوع گاز دیگری برای گازدار کـردن دوغ ممنـوع است.

دوغ گاز دار خود بر دو نوع است: دوغ گاز دار تخمیری و دوغ گاز دار تزریقی.

۲) گرمادیدن دوغ پس از تخمیر: از این دید، دوغ در دو دسته گرما دیده و گرما ندیده طبقه بندی مـی شود. گرمادهی پس از دوره تخمیر ممکن است به منظور غیر فعال کردن میکروارگانیسم های آغازگر و از بین بردن آلودگی های ثانویه احتمالی و در نتیجه آن افزایش مدت زمان ماندگاری دوغ (برای مثـال جلوگیری از تورم بسته ها) انجام شود.

۳) مقدار چربی: از این دیدگاه دوغ دو نوع اسـت: دوغ بـا چربـی (وزنـی/ حجمـی> ۰/۵٪)، دوغ بـدون چربی(وزنی/ حجمی< ۰/۵٪).

۴) همگن شدن ماده خشک: از نظر همگن شدن دوغ (نه شیر دوغ سازی) این فرآورده به دو نوع دوغ همگن شده و دوغ همگن نشده تقسیم می شود (استاندارد ملی ایران، شماره۲۴۵۳).

۱-۳-۵- کشک

کشک عبارتست از یک فرآورده فرعی شیر که از جوشانیدن، تغلیظ و خشک کردن دوغی که پس از کره گیری در شرایط روستایی (از زدن ماست) باقی می ماند یا ماست بدون چربی به دسـت مـی آیـد. مـاده اولیه کشک شیر میش، بز، گاو، گوسفند یا مخلوطی از آنها می باشد.

تهیه کشک شامل چهار مرحله است:

۱) تهیه ماست از شیر (شیر ممکن است کامل یا پس چرخ باشد)

۲) کره گیری از ماست (در صورت استفاده از شیر کامل) در وسایل کره گیری روستایی

۳) جوشانیدن دوغ حاصل از کره گیری یا ماست بدون چربی

۴) صاف کردن و خشک کردن کشک حاصل

معمولا در مرحله چهارم قبل از صاف کردن مقداری نمک به کشک اضافه کرده و مخلوط حاصـله را روی کرباس صاف می نمایند. مایعی که از صاف کردن این مخلوط بدست می آید پس از جوشـاندن و تغلـیظ

قره قروت نامیده می شود و آنچه روی کرباس باقی می مانـد کشـک اسـت کـه معمولـاً آن را در آفتـاب خشکانیده ، قبل از خشک شدن کامل به صورت قطعاتی با کارد می برند یا با دست به اشکال مختلف در می آورند (استاندارد ملی ایران، شماره ۱۱۸۸).

۱-۴- آشنایی با واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) وتوالی یابی برای شناسایی و جداسازی باکتری ها

اختراع واکنش زنجیره ای پلیمراز نقطه عطفی در تاریخ علوم زیستی و پزشکی است. کاربرد PCR نه تنها به طور کامل در زمینه تحقیقات ژنتیک مولکولی انقلابی ایجاد کرده است، بلکـه ایـن تکنیـک ارتبـاط و کارایی مبتکرانه خود را در زمینه های دیگر علم پزشکی قـانونی، سیسـتماتیک مولکـولی، اپیـدمیولوژی مولکولی، باستان شناسی، مردم شناسی، ژنتیک تکاملی و غیره نیز ثابت کرده اسـت (بهلـولی خیـاوی و همکاران، ۱۳۹۵).

این روش قادر است با استفاده از تغییرات حرارتی، چندین فرآیند را به طور متـوالی انجـام داده و مقـدار خیلی کمی از ماده اولیه که یک قطعه از ماده ژنتیکی می باشد را تا میلیون ها نسخه تکثیـر نمایـد. بـه علت دارا بودن ویژگی حساسیت بالا، سرعت و سـهولت واکـنش PCR، جایگـاه ویـژه ای در تحقیقـات و تشخیص های مولکولی پیدا کرده است و برای بسیاری از مقالات روش محبوبی به حساب می آید.

اصول اولیه PCR اولین بار در سال ۱۹۷۱ گزارش شد اما استفاده از این تکنولوژی پس از کشـف آنـزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت Taq[1] آسان شد (جامی الاجمدی و افضل جوان، ۱۳۹۶).

در سال ۱۹۶۹، توماس دی براک، ترمووس اکواتیکوس[2] (گونه جدیدی از باکتری گرما دوست موجود در بخش زیرین چشمه آب گرم پارک ملیYellowstoneرا جداسازی کرد. در سال۱۹۷۶، آنـزیم مقـاوم بـه حرارت پلیمراز Taq از این باکتری ایزوله شد. در سال ۱۹۸۶ هنری ارلیش استفاده از Taq Polymerase را در PCR خبر داد. چون این آنزیم می تواند فعالیت خود را در طیف وسیعی از درجه حرارت بالا حفـظ

[1]Taq Polymerase
[2]Thermus Aquaticus

کند، اضافه کردن آن به مخلوط PCR، کل روند PCR را بدون نیاز به اضافه کردن دستی DNA پلیمراز تازه از اشرشیاکلی در هر چرخه واکنش کوتاهتر می کند زیرا DNA پلیمراز اشرشیاکلی قادر بـه تحمـل گرمایش سرمایش سریع نیست (بهلولی خیاوی و همکاران، ۱۳۹۵).

در ابتدا چرخه حرارتی به صورت دستی با انتقال نمونه ها از یک حمام آب به دیگری و افزودن آنزیم تازه در هر چرخه بعد از مرحله باز شدن DNA از هم انجام می گرفت. امروزه بعد از ۳۰ سال ما خوش شانس هستیم که دستگاه های سایکلر حرارتی[1] به همراه آنزیم ها و معـرف هـای دیگـر مخصـوص کاربردهـای مختلف PCR را در دسترس داریم.

۱-۴-۱- اصول واکنش **PCR**

واکنش زنجیره ای پلیمراز، تکثیر آنزیمی وابسته به پرایمر[2] (آغازگر) توالی خاصـی از DNA ژنـومی یـا کلون شده می باشد. DNA الگو محتوی توالی هدف اسـت کـه مـی توانـد طـولی از دهها تـا هـزاران نوکلئوتید داشته باشد. آنزیم پلی مراز مقاوم به حرارت مانند Taq پلیمراز، واکنش بافری را با استفاده از یک جفت پرایمر و چهار داکسی نوکلئوتید تری فسـفات[3](dNTP) کاتـالیز مـی کنـد کـه میلیـون هـا رونوشت از توالی هدف را تولید می نماید.

روند انجام واکنش PCR نیاز به یک مجموعه تکراری از مراحل بنیادی دارد که یک چرخه PCR را می سازند. باز شدن DNA الگوی دو رشته ای[4]، اتصال دو الیگو نوکلئوتید پرایمر بـه الگـوی تـک رشـته[5] و گسترش یا طویل شدن آنزیمی پرایمرها[6] که رونوشت هایی را تولید می کند که میتوانند به عنوان الگو در چرخه های بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

رونوشت های هدف دو رشته ای هستند و به مکان اتصال پرایمرهای پیوند یافته بـه آنهـا محـدود مـی شوند. انتهای ´۳ پرایمر باید دقیقا مکمل ناحیه هدف باشد اما انتهای ´۵ می تواند شـامل یـک دم غیـر

[1]Thermo Cycler
[2] Primer
[3] Deoxy Nucleoside Tri Phosphates
[4] Denauration
[5] Annealing
[6] Extension/Elongation

مکمل همراه با جایگاه های برش آنزیم محدود کننده باشد. مرحله باز شدن دو رشته DNA از هم در دمای ۹۴ تا ۹۶ درجه سانتی گراد به سرعت انجام می گیرد. DNA دو رشته ای در دمایی متناسب با مقدار G + C آن دناتوره می شود. هر چند درصد G + C بیشتر باشد دمای بالاتری جهت جدا کردن رشته های DNA مورد نیاز است. اتصال پرایمرها به رشته الگو وابسته به دمای T_m[1] یا دمای ذوب هیبرید پرایمر- الگو است. گسترش پرایمر برای اکثر الگوها در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد صورت می گیرد که دمای بهینه برای فعالیت آنزیم Taqپلیمراز می باشد. تکثیر استاندارد معمولاً شامل ۲۵-۳۰ چرخه می باشد (جامی الاجمدی و افضل جوان، ۱۳۹۶).

۱-۴-۲- مزایا و معایب تکنیک PCR

به خاطر این که تکثیر با پرایمرهای مکمل انجام می شود تکنیک بسیار اختصاصی است. به علت تولید میلیون ها نسخه از طریق تکثیر در کمتر از سه ساعت، روش نسبتا سریعی است. بر اساس نوع ماده ژنتیکی (DNA یا RNA) تغییرات مناسب را می توان به راحتی اعمال کرد و تکنیک به راحتی برای طیف وسیعی از کاربردها تقریباً در تمام رده های موجودات از میکروارگانیسم ها تا سلسله گیاهان و جانوران قابل استفاده است. در کنار این مزایا و قابلیت اجرا تکنیک معایب بالقوه ای نیز دارد. اولین و مهم ترین عیب هزینه آن است. در مقایسه با آزمون های سنتی تکنیکی گران قیمت است. انجام PCR به درجه بالایی از مهارت و تخصص نیاز دارد. علاوه بر این جهت انجام PCR باید دانش دقیقی از بیوانفورماتیک برای طراحی پرایمرها، برای وارد کردن جایگاه های محدود کننده و غیره داشت. این تکنیک فقط در آزمایشگاه هایی قابل دسترس است که به طور ویژه ای تکنیک های آزمون و آنالیز بیولوژی مولکولی را دارند. در بیشتر مواقع اسیدهای نوکلئیک از ارگانیسم های غیر زنده نیز همراه با نمونه مورد نظر تکثیر می شوند. آنالیز نمونه پس از PCR پژوهشگر را در معرض مواد شیمیایی مضری همچون اتیدیوم بروماید، رنگ ها، فلوئورو کروم ها و نور UV (در فصل سوم در بخش روش ها کاربرد

[1]Temperature Melting

هریک از این مواد توضیح داده شده است) قرار می دهد که سرطان زا هستند (بهلولی خیاوی و همکاران، ۱۳۹۵).

فصل دوم

بررسی منابع

در این فصل منابع در سه بخش بررسی شد:

۲-۱- مروری بر پژوهش های انجام شده در راستای جداسازی و شناسایی و زنده مانی باکتری های اسید لاکتیک و پروبیوتیک ها

۲-۲- بکار گیری روش های پیشرفته تعیین توالی نوکلئوتیدی در بخش 16S rRNA در شناسایی جنس ها و کونه های باکتری های اسید لاکتیک

۲-۳- جست و جو و شناسایی متابولیت های مفید باکتری های اسید لاکتیک

۲-۱- جداسازی و شناسایی و زنده مانی باکتری های اسید لاکتیک و پروبیوتیک ها

بنابر اهمیت حفظ قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی در محصولات فراسودمند، فرآیند ریزپوشانی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی مورد توجه اکثر محققین قرار گرفته است. بیشتر فعالیت-هایی که در این زمینه انجام شده است در خصوص قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی در ماست بوده است و به دلیل شرایط خاص محصولات لبنی از نظر محیط کشت، pH و اسیدیته و نیز مصرف بالای آن توسط مردم اکثر محققان توجه‌شان را به تولید این نوع محصول پروبیوتیکی معطوف داشته-اند و به تبع آن فرآیند ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیکی نیز بیشتر در این فرآورده گزارش شده است. با توجه به تنوع گونه های این باکتری ها و متابولیت های خاص هر گونه در هر محصول مطالعات متعددی از دیر باز صورت گرفته است. همچنین به دلیل شرایط خاص محیط معده‌ای و روده‌ای برخی محققین قابلیت زنده‌مانی این میکروارگانیسم‌ها را در شرایط شبیه‌سازی شده معده‌ای و روده‌ای ارزیابی کرده‌اند.

دعوتی و همکاران (۲۰۱۷)، در پژوهشی انتروکوکوس فاسیوم، انتروکوکوس دورانس، پدیوکوکوس اسیدی لاکتیس، لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم، لاکتوباسیلوس فرینتوشنیسز، لاکتوباسیلوس جانسونئی و لاکتوباسیلوس دلبروکی را از ماست گوسفندی عشایر الوند جداسازی کردند.

رخ تابناک و همکاران (۲۰۱۵)، به جداسازی و شناسایی باکتری های لاکتوباسیلوس با پتانسیل پروبیوتیکی از لبنیات سنتی کرمان نمودند. در این تحقیق ۲۶ سویه لاکتوباسیلوس از نمونه های شیر، ماست و پنیر بومی، جداسازی شدند. تمامی جدایه ها از لحاظ مقاومت به اسید و تحمل نمک های صفراوی مورد بررسی قرار گرفتند. اثر ضدمیکروبی این جدایه ها روی باکتری های پاتوژن لیستریا مونوسایتوژنز، انتروکوکوس فکالیس، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس با استفاده از روش چاهک مورد مطالعه قرار گرفتند. سپس سویه های مقاوم به شرایط اسیدی و نمک های صفراوی که اثر ضد میکروبی خوبی از خود نشان دادند، توسط توالی یابی ژن 16S rRNA شناسایی شدند. دو سویه بیشترین مقاومت را به شرایط فوق از خود نشان دادند که متعلق به لاکتوباسیلوس کازئی بودند.

حاجی قاسمی و مژگانی (۲۰۱۵)، با تحقیق بر روی ۲۰ سویه از باکتری های اسید لاکتیک بومی که قبلاً جدا شده بود به بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی برای شناسایی و بررسی خواص پروبیوتیکی آنها پرداختند. طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق، سویه های پلانتاروم و رامنوسوس مورد بررسی قادر به تحمل و رشد در pH های مختلف در طی زمان های مذکور بودند.

سلیمی نمین و همکاران (۲۰۱۴)، به جداسازی و شناسایی باکتری های اسید لاکتیک از شیر خام و تعیین فعالیت اسیدی آنها پرداختند. در این پژوهش عملکرد ۶ جدایه از لاکتوباسیل های شناسایی شده در شیر خام اردبیل و سراب با تعیین خصوصیات اسیدیفیکاسیون از طریق اندازه گیری pH بررسی شد. دامنه تغییرات pH توسط جدایه های مورد بررسی طی ۴۸ ساعت در محیط کشت از ۱/۶۵ تا ۲/۰۵ متغیر بود. دامنه تغییرات pH پس از ۲۴ ساعت برای سویه های لاکتوباسیلوس جداسازی شده در کاری مشابه توسط حسنی و همکاران در سال ۲۰۰۸ از ۰/۷۷ تا ۲/۴۵ گزارش شده است. (Hasani, et al., 2008) و نتایج کاهش میزان pH با نتایج تحقیق پیراینو و همکاران (۲۰۱۰) و کای و همکاران (۲۰۰۷) (Piraino, et al., 2010 ; Cai, et al., 2007) نیز مطابقت داشت. بر اساس

گزارش این محققان بین باکتری های اسید لاکتیک، به جز لاکتوباسیلوس های مورد استفاده به عنوان آغازگر ، لاکتوباسیلوس کازئی بیشترین کاهش pH را نشان داد.

کارمیناتی و همکاران (۲۰۱۴)، مشاهده کردند که نگهداری شیر الاغ در ۴ درجه سانتی گراد باعث کاهش باکتری های لاکتوکوک و لاکتوباسیل در شیر می شود. وجود میزان زیاد لیزوزیم (۴۰۰۰mg/l) در شیر الاغ از جمله موانع تکثیر این قبیل باکتری هاست به گونه ای که وجود لیزوزیم زیاد در شیر الاغ باعث هیدرولیز باند های گلیکوزیدی پلی ساکاریدهای موجود در دیواره باکتری ها می شود (Carminati, et al., 2014).

نیک بخت و همکاران (۲۰۱۴)، به بررسی مقایسه ای زنده مانی پروبیوتیک های انتخابی در ماست قالبی کم چرب حاصل از شیر هموژنیزه شده تحت شرایط دمایی و مراحل متفاوت پرداختند. این پروبیوتیک ها عبارت بودند از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس که نتایج تیمار حرارتی و افزایش تعداد مراحل هموژنیزاسیون موجب افزایش قابلیت زنده مانی این باکتری ها شد.

زاهدی و همکاران (۲۰۱۴)، در پژوهشی به بررسی قابلیت زنده مانی باکتری های آغازگر ماست (استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس) در ماست غنی شده با فلاونوئید و روغن استخراج شده از پوست پرتقال پرداختند. نتایج نشان داد که افزایش میزان روغن اثر منفی روی باکتری های آغازگر داشت.

در یک بررسی Natalia و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که نمونه های پنیر تازه تولید شده با شیر تخمیری حاوی باکتری های پروبیوتیک، در روز ۲۸ ذخیره سازی دارای $۱۰^{۷}$و$۱۰^{۸}$CFU/gr باکتری پروبیوتیک با خاصیت عملکردی ویژه می باشند (Natalia, 2013).

دری و همکاران (۲۰۱۳)، به جداسازی سویه های مختلف لاکتوباسیلوس ها از فرآورده های لبنی جهرم پرداختند. در این تحقیق شناسایی لاکتوباسیلوس ها بر اساس رنگ آمیزی، مورفولوژی، محیط کشت، خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیکی صورت گرفت. اثر بازدارندگی لاکتوباسیلوس های جدا شده روی رشد باکتری های پاتوژن نیز با دو روش چاهک و دیسک بررسی شد.

عدالتیان و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه ای نشان دادند که محیط MRS آگار برای باکتری های جنس لاکتوباسیلوس مناسب بوده و این جنس در این محیط غالب می باشد (Edalatian et al., 2012).

در تحقیق دیگری که توسط علامه و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد، جدایه لوکونوستوک مزنتروئیدوس زیر گونه مزنتروئیدوس استخراج شده از نوعی ماهی تخمیری، فعالیت ضد باکتریایی خوبی در برابر شاخص های بیماری زای آئروموناس هیدروفیلا، سودوموناس آئروژینوزا و شوانلا پوتریفاسین، به روش Well Diffusion، نشان داد (Allameh et al., 2012).

سرمست قهفرخی و همکاران (۲۰۱۲)، به جداسازی لاکتوباسیلوس ها از ۳ نمونه ماست و پنیر بومی نقاط مختلف استان چهارمحال و بختیاری پرداختند. آنها ۴۳ جدایه باسیل گرم مثبت کاتالاز منفی را شناسایی کردند. همه جدایه ها به اسیدیته ۲/۵ مقاوم بودند. در این تحقیق مقاومت جدایه ها به اسید و باز، تحمل دمایی، مقاومت به نمک طعام، فعالیت اسیدی سویه ها بررسی شد.

طبق گزارش Chan وهمکارانش (۲۰۱۱)، اسیدهایی مانند اسید هیدروکلریک که در معده انسان نیز یافت می شود، به شدت اکسید کننده بوده و باعث از بین رفتن مولکول های زیستی سلول مانند اسیدهای چرب، پروتئین ها و مولکول های DNA می شود. کاهش pH محیطی می تواند باعث مهار متابولیسم و کاهش رشد و زنده مانی لاکتوباسیل ها شود (Chan et al., 2011).

ساهادوا و همکاران ۲۰۱۱ نیز در تحقیقی مشابه عنوان کردند زنده مانی تمامی ایزوله ها به طور معنی داری در pH =۲/۰ نسبت به pH =۳/۰ و pH =۷/۰ کاهش می یابد. همچنین آنها عنوان کردند برای ارزیابی پتانسیل باکتری های اسید لاکتیک جهت معرفی آنها به عنوان سویه های پروبیوتیک بررسی مقاومت آنها به نمک های صفراوی ضروری است (Sahadeva, et al., 2011).

حسنی و همکاران در سال ۲۰۱۱ باکتری های لاکتوباسیلوس را از پنیر سنتی لیقوان جداسازی و شناسایی نمودند که در میان سویه های جدا شده، گونه های غالب متعلق به گونه های پلانتاروم و کازئی بودند. (Hasani et al., 2011).

بهادری و همکاران در سال ۲۰۱۰ برای جداسازی لاکتوباسیلوس ها از شیرخام، پنیر لرستان و همدان نیز پژوهشی انجام دادند. با استفاده از محیط MRS مایع و MRS جامد، لاکتوباسیل های متنوعی جداسازی شد که نشانگر مناسب بودن شرایط موجود برای رشد لاکتوباسیلها در شیرهای محلی بود. اما لاکتوباسیل ها با کشت شیرهای پاستوریزه در محیط MRS مایع حتی بعد از غنی کردن محیط با عصاره مخمر و سپس کشت در محیط جامد رشد نکردند. این کار در خصوص پنیر پاستوریزه و محلی نیز صورت گرفت و به بررسی وجود آنزیم بتا گالاکتوزیداز در این محصولات پرداخته شد نتیجه این بود که لاکتوباسیلهای مقاوم به حرارت آنزیم بتا گالاکتوزیداز تولید می کنند لذا پیشنهاد شد در فرآورده های پروبیوتیک از لاکتوباسیل های مقاوم به حرارت و یا از آنزیم خالص بتا گالاکتوزیداز استفاده شود و با توجه به این که وجود گلوکز بر روی اپرون لاکتوز اثر منفی دارد و در هنگام هیدرولیز لاکتوز تولید می شود را باید به طریقی از مواد لبنی خارج کرد (Bahadori et al.,2010).

کارمیناتی و همکاران در سال ۲۰۱۰ با انکوبه کردن شیر در دماهای ۳۷، ۴۵، ۶۲ و ۶۵ درجه سانتی گراد مشاهده کردند که تعداد باکتری های استرپتوکوکوس و انتروکوکوس در مقایسه با سایر باکتری ها افزایش پیدا کرد (Carminati et al., 2010).

قطبی و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر اساس آزمون های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی موفق به شناسائی لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس پارا کازئی و لاکتوباسیلوس پنتوسوس از پنیر لیقوان شدند (Ghotbi et al., 2010).

جدایه هایی که توسط آزیز و همکاران در سال ۲۰۰۹ از شیر بوفالو جدا شده به عنوان لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس شناخته شدند (Aziz et al., 2009).

احمدی و همکاران در سال ۲۰۰۹ و حسنی و همکاران در سال ۲۰۰۸ لاکتوباسیلوس لانتاروم را از پنیر لیقوان جداسازی و شناسایی کردند (Ahmadi et al., 2009; Hasani et al., 2008).

همچنین ژانگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ پس از نگهداری نمونه های شیر الاغ در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت به این نتیجه رسیدند که ترکیبات ضدمیکروبی موجود در شیر مثل لیزوزیم و لاکتوفرین قادر به جلوگیری از رشد باکتری های اسید لاکتیک نیستند (Zhang et al., 2008).

در سال ۲۰۰۸ الان- وجتاس و همکارانش، بیفیدو باکتریوم ادولیسنتیس[1] را توسط آلژینات ریزپوشانی کردند و تحت شرایط شبیه سازی روده و معده زنده مانی آنها را مورد بررسی قرار دادند. آنها دریافتند که تعداد سلولهای ریزپوشانی شده زنده مانده در اثر عبور از شرایط معده و روده برابر ۷,۶ CFU/g و تعداد سلول‌های ریزپوشانی نشده در همین شرایط برابر ۶,۴ CFU/g بود که نتیجتاً ریزپوشانی اثر محافظت کنندگی معنی داری در برابر شرایط محیطی برای باکتری‌های پروبیوتیک اجرا می‌کند (Allan- Wojtas et al., 2008).

در سال ۲۰۰۸ سویه ای از لاکتوباسیلوس ساکئی که جزء گونه های معمول در محصولات گوشتی است و در نمونه های لبنی کمتر گزارش شده است توسط آمور و همکارانش در پنیر ایتالیایی سولا[2] شناسایی شده است (Ammor et al., 2008).

الگادی و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز سویه هایی از لاکتوباسیلوس های شیرخام را به عنوان لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس شناسایی کردند و بررسی هایی را برای جداسازی لاکتوباسیلوس لانتاروم از شیر خام انجام دادند (Elgadi et al., 2008).

شیباتا و همکاران، با استفاده از ۳ نژاد مختلف لاکتوباسیلوس پلانتاروم به مقادیر متفاوت تولید اسید لاکتیک دست یافتند (Shibata et al., 2007). در مطالعه میردامادی و همکاران، نیز لاکتوباسیلوس پلانتاروم نسبت به لاکتوباسیلوس کازئی مقام دوم از نظر میزان تولید اسید را داشت (Mirdamadi et al., 2007) که با نتیجه تحقیق فوق مشابهت داشت.

1.Adolescentis
2.Sola

با مطالعه ای که کیم و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام به طور موثر میکروارگانیسم را از تیمار اسیدی و دمایی در موقع انتقال به روده، بدون تاثیر منفی بر روی عملکرد پروبیوتیکی، حفاظت می کند (Kim et al., 2006).

۲-۲- بکار گیری روش های تعیین توالی نوکلئوتیدی در بخش 16S rRNA برای شناسایی

دعوتی و حسامی (۲۰۱۸)، به مقایسه تنوع میکروبی دوغ گوسفندی عشایر ناحیه سومار به کمک روش های نسل جدید توالی یابی و مولکولی وابسته به کشت پرداختند. در این پژوهش از سه نمونه دوغ گوسفندی مجموعاً ۴۰ باکتری اسید لاکتیک جدا گردید. این جدایه ها بر اساس روش مولکولی وابسته به کشت، توسط تکثیر ژن 16S-rRNA با پرایمرهای یونیورسال27F و 1492R و توالی یابی به صورت ۲۰٪ *Lactobacillus apis*، ۱۰٪ *Lactobacillus ultunensi*، ۱۰٪ *Pediococcus argentinicus* و ۴۰٪ *Lactobacillus delbrueckii* شناسایی گردیدند.

کمال و همکاران در سال ۲۰۱۸ در تحقیقی به شناسایی و جداسازی بیوشیمیایی و مولکولی ماست های نوار غزه پرداختند. آنها شش نمونه ماست خانگی سنتی تهیه شده از شیر گاو را جمع آوری کردند و با روش های بیوشیمیایی و میکروسکوپی شناسایی اولیه صورت گرفت و سپس جداسازی کشت های جدا شده توسط PCR-ARDRA[1] (روش آنالیز محدودگر DNA ریبوزومی تکثیری) صورت گرفت و دو باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس (۳ جدایه) و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (دو جدایه) را شناسایی کردند (Kamal et al., 2018).

کفیلی و علی نسائی (۲۰۱۷)، به شناسایی و بررسی گوناگونی ژنتیکی باکتری های اسید لاکتیک غیر آغازگر، در پنیر رسیده تالشی با روش مولکولی و PCR پرداختند. آنها ۵۴ سویه وحشی باکتری اسید لاکتیک را در محیط های M_{17} و MRS ایزوله نمودند و پس از استخراج DNA با روش RAPD

[1] Amplified ribosomal DNA restriction

PCR - و نرم افزار MVSP خوشه بندی کردند. گونه ها توسط آزمون 16S-rRNA شناسایی شد. شش بیوتایپ اصلی و غالب در این پنیر سنتی شامل جنس ها و گونه های لاکتو باسیلوس پاراپلانتارم، پلانتاروم، ساکئی، پاراکازئی، لاکتوکوکسی ها، گونه های استرپتوکوکوس گالولیتیکوس، انتروکوکوس فکالیس و فیسیوم بودند.

دعوتی و زیبایی (۲۰۱۵)، با آزمایش روی سه نمونه دوغ شتر تک کوهانه ایرانی موفق به جداسازی و شناسایی ۳۲ باکتری در مرحله کشت اولیه بر روی MRS آگار شدند. در میان باکتری های جدا شده از نظر فنوتیپی ۴ جدایه متفاوت شامل لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس فرینتوشنسیز، پدیوکوکوس پنتوسازئوس و انتروکوکوس فسیوم شناسایی شدند. جدایه های باکتریایی توسط تکثیر ژن ناحیه 16S-rRNA به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و آنالیز محدود DNA ریبوزومی تکثیر شده (ARDRA) توسط هضم با آنزیم HaeIII گروه بندی شدند. اما بر اساس آنالیز محدود ژن 16S-rRNA، جدایه های لاکتیکی درون ۵ پروفایل باندی متفاوت گروه بندی شدند که توسط توالی یابی به عنوان لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوس پنتوسوس، پدیوکوکوس پنتوسازئوس، انتروکوکوس لاکتیس شناسایی شدند.

نریمانی و همکاران (۲۰۱۴)، به جداسازی و شناسایی باکتری های لاکتیکی از محصولات لبنی سنتی کلیبر، هریس و ورزقان پرداختند. جهت انجام این مطالعه باکتری های لاکتیکی توسط روش های متداول کشت و شناسایی بر اساس خواص بیوشیمیایی شناسایی شدند و مقاومت به اسید معده و نمک های صفراوی مورد ارزیابی قرار گرفت سپس برای شناسایی دقیق تر با جفت آغازگرهای اختصاصی، ژن 16S rRNA باکتری ها تکثیر داده شد و بعد از خالص سازی محصول PCR ، ژن مورد نظر تعیین توالی گردید. آنها ۱۷ سویه لاکتوباسیلوس و ۶ سویه انتروکوکوس از مناطق کلیبر، هریس و ورزقان جدا نمودند.

نریمانی و همکاران (۲۰۱۳)، به جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری های لاکتوباسیلوس با پتانسیل پروبیوتیکی از شیر گاوی و ماست سنتی شهرستان خوی پرداختند. در این

پژوهش، شناسایی سویه های غربال شده با استفاده از تست های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی صورت گرفت و برای شناسایی دقیق تر از روش مولکولی 16S-rRNA، PCR و توالی یابی استفاده شد. در مجموع ۱۴ سویه لاکتوباسیلوس به عنوان فلور میکروبی طبیعی دارای پتانسیل پروبیوتیکی در منطقه خوی گزارش شد.

تفویضی و همکاران در سال ۲۰۱۳ از غذای سنتی ترخینه و دوغ ترخینه بر اساس توالی 16S-rRNA چهار سویه با تشابه ۹۹٪ به لاکتوباسیلوس کازئی و توانایی تولید باکتریوسین قوی را شناسایی و ثبت نمودند (Tafvizi et al.,2013).

حجازی و همکاران در سال ۲۰۱۲ از ۲۲ ایزوله جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی، ۸ ایزوله را به طور دقیق با دو روش ARDRA و توالی یابی شناسایی نمودند که شامل پنج گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم، دو گونه لاکتوباسیلوس برویس و یک گونه لاکتوباسیلوس کازئی می باشند (Hejazi et al., 2012)

ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۱)، از محصولات لبنی سنتی ماست و پنیر با روش های مبتنی بر کشت و تکثیر ژن 16S rRNA موفق به جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس برویس شدند.

لطفی و همکاران (۲۰۱۰)، با توالی یابی ناحیه 16S rDNA، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و انتروکوکوس هیرا را در پنیر مناطق هریس و سراب شناسایی کردند.

سنگان و همکاران در سال ۲۰۰۹ از محصول تخمیری مخلوط شیره گندم و ماست، ۲۲۶ ایزوله گرم مثبت و کاتالاز منفی را جداسازی و با روش های مولکولی Rep-PCR و توالی یابی 16S rRNA و پروفایل استفاده از کربوهیدرات ها، شناسایی نمودند (Sengun et al., 2009).

در مطالعه ای که فورتینا و همکاران در سال ۲۰۰۶ با توالی یابی 16S rRNA، سویه جدیدی از انتروکوکوس ها به نام انتروکوکوس ایتالیکوس را از پنیر های محلی ایتالیایی گزارش کردند (Fortina et al., 2006).

۲-۳ جست و جو و شناسایی متابولیت های مفید باکتری های اسید لاکتیک

Abid و همکاران در سال ۲۰۱۷، روی تولید ۴ اگزو پلی ساکارید تولید شده توسط جدایه های باکتری های اسید لاکتیک که از غذاهای تخمیری و نوشیدنی های تخمیری ایزوله شده بود پژوهش انجام دادند. آنها از سوسیس های تخمیری گاوی و بوقلمون (BMS و TMS)، شیره خرما (DPS)، و شیر گاو (CM) به ترتیب *Leuconostoc* Citreum -BMS, *Leuconostoc Mesentroides* - TMS, *Leuconostoc Pseudo Mesentroides* - CM , *Pediococcus Pentosaceus*- DPS را شناسایی کردند. سویه های جدا شده توانایی مقاومت در برابر شرایط شبیه سازی شده معده و روده انسان (pH پایین، لیزوزیم، نمک های صفراوی، پپسین و شیره لوزالمعده) را نشان داد و آبگریزی ۷۹- ۹۰٪ در سطح داشت و توانایی عمل بر علیه اشرشیاکلی را داشتند بنابراین این ایزوله ها را می توان بالقوه پروبیوتیک در نظر گرفت. EPS تولید شده مرتبط با رشد بود که نشان می دهد آنها متابولیت اولیه هستند. وزن مولکولی آنها بالاتر از ۱۰۶ دالتون بود و نتایج حاصل از HPLC و NMR بیانگر آن بود که همه نمونه ها ترکیبی از دکستران و لوان بود. بعلاوه، نمونه های اگزو پلی ساکارید توانایی بازدارندگی و از هم گسیختگی بیو فیلم های پاتوژنیک را داشته که نشان می دهد مقاومت حرارتی بالایی دارد که به آن این اجازه را می دهد که در غذاهای پروسس شده حرارتی استفاده شود (Abid et al., 2017).

Lee و Pike در سال ۲۰۱۷ به مطالعه در خصوص ترکیبات زیستی با استفاده از باکتری های اسید لاکتیک مانند ترکیبات فنلی، GABA، جینسنوزید ها پرداختند. آنها عنوان کردند باکتری های اسید لاکتیک مواد مختلفی مانند اسید لاکتیک، β - گلوکوزیداز و β- گالاکتوزیداز تولید می کنند که این متابولیت ها آنها را به عنوان استارتر های تخمیری سودمند ساخته است. مواد فعال عملکردی به عنوان پایه های تخمیر مورد ارزیابی قرار گرفتند و ترکیبات زیستی که توسط باکتری های اسید لاکتیک تولید شد شامل جینسنوزید به مقدار کم، گاما آمینو بوتیریک اسید، آگلیکان، ایزو فلاون های بیواکتیو، جنیستئین و دایدزئین بودند. تخمیر با سوبستراهایی مثل ترکیبات فنلی و پلی ساکاریدها

توسط جدایه هایی از باکتری های استرپتوکوکوس ترموفیلوس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و بیفیدو باکتریوم جریان یافت (Lee and paik., 2017).

تاکنون گزارشی مبنی بر تولید ε - پلی ال لایزین از گونه های اسید لاکتیک باکتری نشده است. در ایران برای شناسایی آن در منابع مختلف تحقیقی صورت نگرفته است و در سراسر دنیا نیز افراد انگشت شماری به جست و جوی این متابولیت پرداخته اند:

Chedda و Vernekar در سال ۲۰۱۴، در طی پژوهشی باکتری باسیلوس سرئوس را به عنوان یک منبع تولید ε - پلی ال لایزین معرفی کردند (Chedda & Vernekar., 2014).

به دنبال آنها Anuj و همکاران در سال ۲۰۱۵ روی تولید ε - پلی ال لایزین توسط باسیلوس سرئوس با استفاده از منابع پروتئینی و قندی کار کردند. استفاده ازسوبستراهایی مانند منابع پروتینی و قندی، نشان داد که گلوکز منبع مناسب تولید ε - پلی ال لایزین می باشد (Anuj et al., 2015).

میر دامادی و تنگستانی (۲۰۱۱)، به شناسایی و جداسازی و تخلیص لاکتوباسیلوس های بومی جدا شده از محصولات لبنی سنتی و بررسی اثر باکتریوسین های تولیدی توسط آنها پرداختند. از میان هشت سویه جدا شده دو سویه با نام های 4b و 48 با طیف اثر وسیع انتخاب و باکتریوسین تولیدی آنهاخالص گردید. این دو سویه تقریباً علیه تمام سویه های استاندارد با قدرت متفاوت اثر مهاری داشتند و قویترین سویه ها از نظر تولید باکتریوسین بودند. یکی از این باکتریوسین ها نایسین بود که روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسایتوژنز و گونه های مختلف باسیلوس و کلستریدیوم اثر باکتری کشی دارد اما به طور خالص روی باکتری های گرم منفی بی تأثیر است. این مطالعه نشان داد باکتریوسین های تولید شده توسط این لاکتوباسیل ها قادر به مهار طیف وسیعی از میکروارگانیسم های بیماری زای موجود در مواد غذایی می باشند و می توانند به عنوان نگهدارنده های بیولوژیک در فرآورده های غذایی مورد استفاده قرار گیرند.

فصل سوم

مواد و روش ها

درسالهای اخیر دانشمندان زیادی باکتری‌های اسیدلاکتیک و لاکتوباسیلها را از محصولات سنتی در سراسر دنیا به خصوص مناطق بکر جداسازی و شناسایی نموده‌اند. مطالعاتی که در ایران در زمینه لاکتوباسیل‌ها صورت گرفته بیشتر با هدف کاربرد در صنایع غذایی و بهینه سازی کیفیت فرآورده های لبنی بوده و انجام آنالیزهای مولکولی به منظور شناسایی یا تعیین ویژگی های خاص بیوشیمیایی کمتر مورد توجه بوده است. در همین زمینه تحقیقاتی با استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک در رابطه با کنترل بیماریهای گوارشی انجام شده و نتایج تحقیق نشان داده است که این باکتری‌ها توانایی کنترل بیماریهای گوارشی از قبیل اسهال را دارا می‌باشند.

با افزایش جمعیت و نیز بالا رفتن فرهنگ مصرف فرآورده های لبنی درحال حاضر روزانه درکارخانجات صنایع لبنی کشورمان بیش از هزاران تن فرآورده لبنی تولید می‌شود. با توجه به مصرف روز افزون فرآورده های لبنی از جمله ماست و پنیر، نیاز به باکتریهای اسید لاکتیک به عنوان استارتر نیز بیشتر می‌شود. با بررسی‌های میدانی و آماری به عمل آمده در کارخانجات تولیدی صنایع لبنی مشخص گردید صنایع مزبور در کشور کاملا وابسته به تأمین این باکتریها از خارج از کشور می‌باشند. این وابستگی درحدی است که اگر محدودیتی در مورد فروش استارترها به ایران اعمال شود، کارخانجات صنایع لبنی قادر به تولید ماست و پنیر نخواهند بود. ازطرف دیگر با توسعه صنایع لبنی در کشور و ترویج فرهنگ بهداشت مواد غذایی و احتمال وجود آلودگی در فرآورده های لبنی سنتی، مصرف فرآورده های لبنی حاصل از این صنعت در اقصی نقاط کشور جایگزین مصرف فرآورده های لبنی سنتی شده لذا تولید سنتی فرآورده های فوق، بصورت چشمگیری کاهش یافته است. از اینرو بسیاری ازسویه‌های بومی باکتریهای اسید لاکتیک در حال نابودی می‌باشند.

بررسی ابعاد مختلف این مسئله نشان می‌دهد که از بین رفتن این سویه ها را می‌توان به عنوان یک ضرر جبران ناپذیر ملی و حتی جهانی در نظر گرفت. این تحقیق به منظور جداسازی لاکتوباسیل‌های بومی در یک منطقه کشور و بررسی خصوصیات بیوشیمیای آنها انجام شد. سپس هشت ایزوله مورد بررسی‌های مولکولی دقیق‌تر (تعیین توالی کامل 16SrRNA) قرار گرفت پس از آن بر اساس توالی

کامل 16S rRNA رده بندی باکتری‌ها و تهیه درخت فیلو ژنتیکی این باکتری‌ها انجام شد و در مرحله نهایی متابولیت ε - پلی ال لایزین جستجو شد.

۳-۱- مواد شیمیایی، محیط های کشت و محلول های مورد نیاز

۳-۱-۱- مواد و محیط های مورد نیاز در مرحله ایزوله سازی سوش و شناسایی میکروسکوپی

۱- قرص رینگر کمپانی مرک آلمان

۲- رقیق کننده فسفات هیدروژن پتاسیم کمپانی کارلو

۳- محیط های کشت MRS Broth ، MRS Agar کمپانی کیولب

۴- گاز پک نوع A کمپانی مرک

۵- نوار تست بیهوازی Anaerotest مرک

۶- کریستال ویوله

۷- لوگول

۸- الکل استن

۹- سافرانین

۳-۱-۲- مواد، ابزار و محیط های مورد نیاز در مرحله آزمایشات بیوشیمیایی

۱- قندهای گالاکتوز، رافینوز، مانیتول، فروکتوز، مالتوز، لاکتوز، سوربیتول، گلوکز، سوکروز، نشاسته خریداری شده از نمایندگی شرکت مرک

۲- فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرون

۳- لوله دورهام

۴- اسید کلریدریک ۱ نرمال خریداری شده از نمایندگی کمپانی کارلو

۵- نمک های صفراوی با برند مرک

۶- آگار- آگار با برند مرک

۳-۱-۳- محلول های مورد استفاده در استخراج DNA، PCR و الکترفورز

۱- کیت DNA Cinna Pure برای باکتری های گرم مثبت از شرکت سیناژن Cat.NO: EX6021

۲- بافر لود کننده

۳- آگارز

۴- بافر الکتروفورز TBE[1]

۵- آب فاقد نوکلئاز (آب مقطر)

کلیه مواد به استثناء آب مقطر از شرکت سیناژن خریداری شد.

۳-۱-۴-مواد مورد استفاده در شناسایی ε- پلی ال لایزین

۱- گلوکز آن هیدراته ساخت شرکت BIOCHEMICA

۲- آگار ساخت شرکت مرک

۳- گلیسرول ساخت شرکت مرک

۴- عصاره مخمر ساخت شرکت لیوفیل کم ایتالیا

۵- پودر سویا طبیعی خشک مارک سبحان

۶- KH_2PO_4 ساخت شرکت کارلو

۷- $MgSO_4$ ۷ آبه ساخت شرکت کارلو

۸- $(NH_4)_2SO_4$ مارک Fluka Chemika

۶- $FeSO_4$ ساخت شرکت کارلو

۷- بافر فسفات ساخت شرکت کارلو

[1]Tris base, Boric acid, EDTA

۸- تریپان بلو خریداری شده از شرکت سینا ژن

۹- محلول پلی ال لایزین ۰/۱ ٪ ساخت شرکت TITRACHEM

۳-۲- دستگاه ها و وسایل مورد استفاده در آزمایشات:

- دستگاه سانتریفیوژ 5810R ساخت شرکت Eppendorf
- دستگاه ورتکس Micro-Spin ساخت شرکت SiGmA
- دستگاه بن ماری سرولوژی ساخت شرکت Memmert
- دستگاه Termal Cycler ساخت شرکتBIO RAD
- ترازوی دیجیتالی Sartorius مدل TE 1245
- مایکرو ویو LG
- فریزر Samsung ساخت کشور کره
- هود لامینار ساخت شرکت به آزما سکو کلاس 2
- اتوکلاو ایران تولید مدل 043-A
- سمپلرمتغیر Brand ساخت کشور آلمان
- الکتروفورز
- اسپکتروفوتومتر UNICO مدل UV2150
- انکوباتور کاوش مگا
- شیکر انکوباتور IKA – KS3000 i
- ترانس لومینار QUANTUM- ST4 1100/20M

۳-۳- روش انجام آزمایش:

۳-۳-۱- جمع آوری نمونه ها

از بهار و تابستان ۱۳۹۵جمع آوری نمونه ها آغاز و تا مهر ماه سال ۱۳۹۶ ادامه داشت. نمونه های موردنظر از حومه شاهرود (روستاها و مراتع بکر) شهرهای مجن، کلاته خیج، کالپوش، محصولات لبنی سنتی نظیر ماست، دوغ، کشک، کره حیوانی تهیه شد و در ظروف استریل به همراه یخ خشک به آزمایشگاه انتقال یافت.

۳-۳-۲- جداسازی میکروارگانیسم از فرآورده های لبنی سنتی

بعد از رقت سازی تا $۱۰^{-۸}$ در پلیت از رقت های$۱۰^{-۵}$ تا $۱۰^{-۸}$ به روش pour plate با استفاده از محیط کشت اختصاصی MRS-Agar کشت داده شد سپس در جار بیهوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بمدت ۵ تا ۷ روز انکوبه گذاری گردید.

بعد از رشد کلنی ها با توجه به شکل مورفولوژی (شکل ۳-۱) کلنی های رشد یافته از نظر تست کاتالاز و تست گرم مورد بررسی قرار گرفت. جدایه های گرم مثبت و کاتالاز منفی جداشده برای بررسی های بعدی در محیط MRS مایع کشت داده شد.

شکل ۳-۱: کشت Pour Plate نمونه ها روی MRS آگار

۳-۳-۳- رنگ آمیزی افتراقی گرم

معروف‌ترین نوع رنگ آمیزی مرکب، نوع گرم می‌باشد. این روش مفیدترین روش تشخیص باکتری‌ها می‌باشد. ابتدا از نمونه باکتری یک گسترش روی لام تهیه شد. سپس مقداری از رنگ کریستال ویوله را با قطره چکان به روی سطح گسترش میکروبی روی لام ریخته برای نفوذ رنگ در دیواره سلولی باکتری ۱ دقیقه زمان دادیم. پس از سپری شدن مدت زمان ۱ دقیقه، رنگ اضافی روی لام را خالی کرده و با استفاده از آب مقطر سطح روی گسترش شستشو داده شد. در مرحله بعد چند قطره از محلول لوگل را روی گسترش پخش نموده و بمدت ۱ دقیقه به همان حالت ماند. سپس محلول اضافی را خالی کرده و با آب مقطر لام شستشو داده شد. لام را با زاویه ٤٥ درجه نگه داشته، بعد با استفاده از محلول رنگ بر الکل- استن که برروی گستره ریخته شد بسرعت عمل رنگ بری صورت گرفت. باید دقت کرد که مرحله رنگ بری بیش از اندازه نباشد، بعد از آن لام به سرعت با آب مقطر شستشو داده شد. این عمل، رنگ بری را متوقف کرد. در مرحله بعدی سطح گسترش را با سافرانین پوشانیده و ۳۰ تا ٦۰ ثانیه منتظر ماندیم، بعد از آن رنگ اضافی را خالی کرده و با آب مقطر لام شستشو داده شد، پس از خشک شدن لام در دمای اتاق، گستره با روغن ایمرسیون و میکروسکوپ نوری با عدسی شیئی 100X مشاهده شد (محسنی، ۱۳۸۹).

پس از انجام آزمون گرم کلنی های دارای باکتری میله ای یا کوکو باسیل گرم مثبت انتخاب شد. کلنی های مورد نظر به صورت کلنی تک روی پلیت های جدید MRS جامد به صورت بازکشت به دفعات (به منظور ایزوله سازی دقیق تر و اطمینان از خلوص کلنی های تک) کشت خطی (شکل ۳-۲) داده شد و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت (بسته به رشدکلنی ها) در جار بی هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شد. بعد از رشد مجدد با میکروسکوپ بررسی شد. هدف از این کار جدا شدن مطمئن باکتری های مورد نظر از یکدیگر بود. از آنجا که باکتری های اسید لاکتیک گرم مثبت و کاتالاز منفی هستند، بنابراین برای تشخیص اولیه از تست کاتالاز استفاده شد.

شکل ۳-۲ : کشت خطی نمونه روی سطح MRS آگار

۳-۳-۴- آزمون کاتالاز

با استفاده از این آزمایش می‌توان وجود آنزیم کاتالاز را بررسی نمود. به کمک پیپت پاستور، یک قطره از محلول ۱ درصد پر اکسید هیدروژن روی یک لام تمیز ریخته شد. مقدارکمی از کلنی باکتری به قطره روی لام میکروسکوپی منتقل شد. عدم تولید گاز یا حباب های ریز نشانه منفی بودن آزمایش کاتالاز است. ظهور سریع حباب های زیاد نشانه مثبت بودن آزمایش کاتالاز است.

۳-۳-۵- آزمایشات بیوشیمیایی: آزمون های فیزیولوژیک با بررسی رشد در pH های مختلف (۲/۵، ۴/۵، ۵/۲) و در محیط کشت MRS مایع حاوی غلظت های متفاوت نمک های صفراوی ۰/۲ و ۰/۳٪ و محیط کشت MRS مایع استریل در دو دمای ۱۰ و ۴۴ درجه سانتی گراد به ترتیب ۱ ،۳ و ۷ روز صورت گرفت، که دو آزمون مقاومت به pH اسیدی و نمک های صفراوی برای بررسی پتانسیل پروبیوتیکی انجام شد.

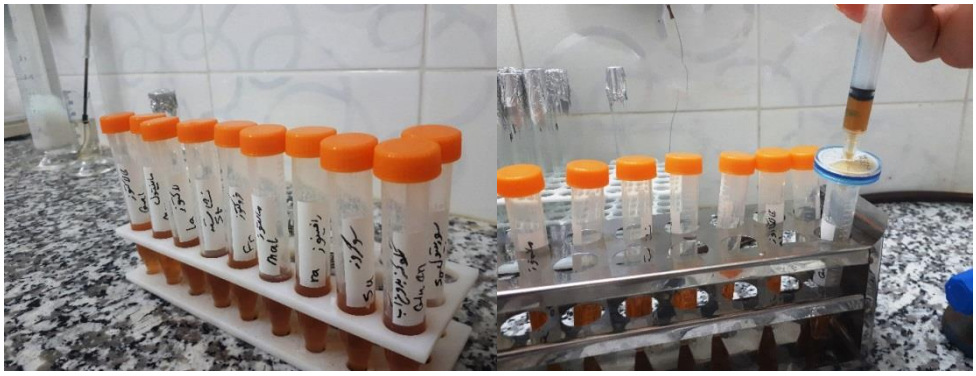
برای انجام آزمایش مقاومت به اسید محیط MRS براث تهیه شده با افزودن اسید کلریدریک ۱ نرمال به pH های ۲/۵، ۴/۵، ۵/۲ رسانده شد و به هر محیط ۱٪ از MRS مرحله قبل اضافه شد. به منظور بررسی میزان مقاومت باکتری های مورد نظر به pH های مختلف، از محیط های کشت مایع دارای pH های متفاوت اسیدی، نمونه برداری شد و روی محیط کشت MRS آگار کشت خطی داده شد و

به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه تحت دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و شرایط بی هوازی قرار گرفتند. پس از گذشت این مدت شمارش باکتری های رشد یافته نشان دهنده میزان رشد باکتری ها و مقاومت آنها به شرایط اسیدی بود. درجه زنده مانی سویه از طریق مقایسه درصد کلنی های رشد کرده بر روی MRS به غلظت کلنی های ابتدایی محاسبه گردید.

در مرحله بعد برای سویه هایی که توانایی بقا در آزمایش مقاومت به اسید را داشتند آزمایش مقاومت به نمک های صفراوی صورت گرفت. بدین منظور باکتری های مورد نظر جهت غنی سازی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محیط MRS براث گرمخانه گذاری شدند پس از گذشت این زمان و ایجاد کدورت درون لوله ها حدود ۰/۲۵ میلی لیتر از کدورت درون لوله ها برداشته شد و در محیطهای MRS براث استریل با درصدهای متفاوت نمک های صفراوی (۰/۲ و ۰/۳٪) تلقیح گردید. لوله ها در زمان ۰، ۲ و ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. بعد از زمان مورد نظر از محتویات لوله در هر تناوب کشت سطحی به عمل آمده و بعد از حدود ۲۴- ۴۸ ساعت انکوباسیون پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و تحت شرایط بی هوازی شمارش کلی کلنی های رشد یافته نمایانگر مقاومت باکتری های مورد نظر به نمک های صفراوی است.

آزمون تخمیر قندها در مرحله بعد انجام شد. برای این آزمون، از قندهای گالاکتوز، رافینوز، مانیتول، فروکتوز، مالتوز، لاکتوز، سوربیتول، گلوکز، سوکروز، نشاسته محلول استوک ۵٪ تهیه شد و با عبور از فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرون استریل شد (شکل ۳-۳). معرف برومو کروزول پرپل نیز با عبور از همین نوع فیلتر غشایی استریل شد. در این آزمایش تولید گاز و اسید تواماً بررسی شد. به این نحو که در لوله آزمایش حاوی پپتون واتر مایع استریل شده با لوله دورهام مقدار ۱ میلی لیتر از نمونه ها که در مراحل قبلی در همین محیط کشت داده شده بود و ۰/۵ میلی لیتر از محلول های قندی به طور جداگانه و ۰/۵ میلی لیتر معرف برومو کروزول پرپل اضافه شد به منظور ایجاد شرایط بیهوازی در سطح این محیط ها آگار ۲٪ ریخته شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گذاری گردید. تغییر رنگ از بنفش به زرد به عنوان نتیجه مثبت تخمیر قند و تولید اسید و

تولید گاز به نشانه نا همگن بودن تخمیر تلقی گردید. نتایج آزمایشات بیوشیمیایی جدایه های شناسایی شده با خصوصیات بیوشیمیایی لاکتوباسیلوس ها در کتاب برگیس مطابقت داده شد و جدایه ها در سطح جنس و گونه شناسایی شدند (Hozapfel & wood, 1995).



شکل ۳-۳: تهیه محلول قندی استوک و استریل با عبور از فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرون

۳-۳-۶- آزمایشات مولکولی

۳-۳-۶-۱- استخراج **DNA** با استفاده از کیت

کیت DNA شامل: ستون های اسپین[1]، آنزیم ها، بافرها، واکنشگرهای مورد نیاز برای لیز کردن[2] ماده، باند دهی DNA با شبکه، بافرهای شست و شو دهنده و پاک کننده DNA به حجم های کوچک از شبکه.

معمولاً به همراه کیت، بافر لایزیس، محلول رسوب دهنده، بافر شست و شو دهنده[3]I، II، بافر پاک کننده[4] مورد نیاز است.

- استخراج DNA با استفاده از کیت تولیدی شرکت سیناژن (Cinna Pure DNA) به شرح ذیل می باشد:

[1]Spin Columns
[2]lysis
[3]Wash BUFFER
[4]Elution BUFFER

در این کیت با روشی ساده و سریع امکان استخراج کل DNA از طیف وسیعی از موجودات از جمله سلول های انسانی، باکتری ها، مخمر، خون و مشتقات آن فراهم می شود. DNA خالص در کمتر از ۳۰ دقیقه استخراج می شود و برای کاربرد های مختلفی از جمله PCR، ساترن بلات و واکنش های آنزیمی دیگر مورد استفاده قرار می گیرد.

ویژگی ها و فواید: این کیت به صورت ستونی بوده، استخراج DNA با دقت بالا، خلوص بالای DNA استخراج شده، عدم استفاده از حلال های آلی، آماده سازی برای استفاده در PCR.

نگهداری محتویات در دمای ۲- ۸ درجه سانتی گراد، نگهداری آنزیم در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد.

مکانیسم:

در این کیت از ستون های سیلیکایی برای خالص سازی DNA استفاده می شود. نمونه های مختلف با کمک دترجنت ها و آنزیم های مختلف لیز می شوند. در شرایط نمکی بالا، DNA موجود در لیز سلولی به غشای سیلیکایی ستون ها متصل می شود و ناخالصی ها از ستون خارج و در تیوب جمع آوری می شود. سپس غشاء توسط الکل برای حذف پروتئین ها، نمک ها و اضافات سلولی شسته می شود در نهایت ستون توسط آب دیونیزه یا بافر با قدرت یونی پایین شسته شده و در نهایت DNA خالص در تیوپ جمع می شود.

افزودن آنزیم پروتئیناز و بافر برای لیز سلولی می باشد.

روش استفاده طبق پروتکل:

۱) ابتدا ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز را به میکروتیوپ اضافه نموده و ورتکس در حداکثر سرعت برای ۲۰ ثانیه صورت پذیرفت.

۲) ۳۰۰میکرولیتر محلول ته نشینی را اضافه نموده و ورتکس با حداکثر سرعت برای ۵ ثانیه صورت پذیرفت.

۳) محلول به ستون چرخشی با لوله جمع آوری به وسیله پیپت انتقال داده شد.

۴) لوله را در دور rpm ۱۳۰۰۰ برای یک دقیقه سانتریفوژ نمودیم. مایع انتهایی را دور ریختیم.

۵) ۴۰۰ میکرولیتر بافر شست و شو I را به ستون چرخشی اضافه کرده و با دور rpm ۱۳۰۰۰ برای یک دقیقه سانتریفوژ کرده و مایع انتهایی را دور ریختیم.

۶) در این مرحله شست و شوی ستون چرخشی با ۴۰۰ میکرولیتر بافر شست و شوی Π صورت گرفت و سپس برای یک دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید و در نهایت مایع انتهایی دور ریخته شد.

۷) همانند مرحله قبل شست و شوی ستون چرخشی با بافر Π و با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید و در نهایت مایع انتهایی دور ریخته شد.

۸) ستون چرخشی را روی لوله جمع آوری قرار داده و برای یک دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید.

۹) در این مرحله با دقت ستون را به یک میکروتیوپ ۲ میلی لیتر منتقل کرده و ۳۰ میکرولیتر بافر خالص سازی که در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد پیش گرم شده را در مرکز ستون ریخته درپوش را بستیم و به مدت ۳- ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه نمودیم. سپس برای یک دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید تا DNA استخراج شود (پروتکل استخراج DNA، شرکت سیناژن).

۳-۳-۶-۲- بررسی کیفیت **DNA** استخراجی توسط دستگاه نانو دراپ

دراسپکتروفتومتر نانو دراپ، سنجش کمی و کیفی نمونه های DNA، RNA، پروتئین و شناسایی آلودگی آنها تنها با حجم ۱-۲ میکرولیتر ظرف چند ثانیه میسر می شود. بدین صورت که بدون نیاز به کووت و تنها با استفاده از ۱ الی ۲ میکرولیتر از نمونه قادر است در زمانی کمتر از ده ثانیه کلیه طول موجهای موجود در طیف مورد نظر را با دقت ۱ نانومتر اسکن نماید و غلظت یا جذب نوری ماده مورد نظر را نیز تعیین کند.

روش کار:

۱) ابتدا با کمک سمپلر حجم کمی از نمونه ها برداشته و بر روی سطح آشکار ساز قرار دادیم.

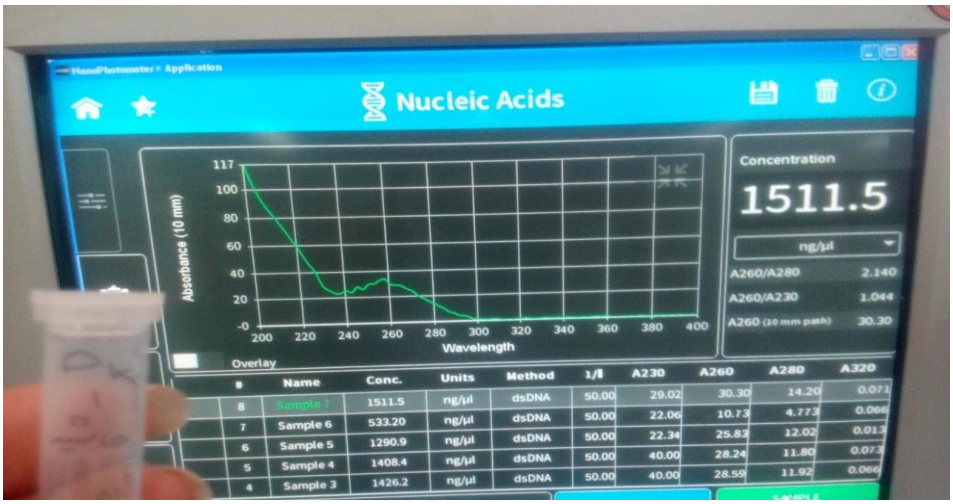
۲) بازوی نمونه دستگاه را بسته و اندازه گیری نمونه با استفاده از نرم افزار متصل به کامپیوتر انجام می شود.

۳) در پایان اندازه گیری، بازوی دستگاه را باز کرده و قسمت بالا و پایین پدال را با دستمال تمیز کردیم.

پاک کردن نمونه از هر دو ستون بالا و پایین پس از اتمام هر اندازه گیری برای جلوگیری از انتقال نمونه و تجمع نمونه ها ضروری است.

۴) پس از آخرین اندازه گیری، تمیز کردن نهایی از تمام سطوح با آب مقطر صورت گرفت.

بعد از استخراج DNA با استفاده از کیت برای بررسی کیفیت DNA استخراجی و غلظت آن درطول موج ۲۶۰ در دستگاه نانو دراپ اندازه‌گیری گردید (شکل ۳-۴).



شکل۳-۴: تصویر حاصل از دستگاه نانو دراپ

۳-۳-۶- انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

در طی انجام واکنش PCR علاوه بر رشته DNA الگو، ترکیبات دیگری چون آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت، بافر، کاتیون های دو ظرفیتی مثل منیزیم، پرایمرها و داکسی نوکلئوتید تری فسفات مورد نیاز است.

۳-۳-۶-۳-۱- نمونه DNA الگو: نمونه الگو می تواند قطعه ای از DNA، محصول استخراج DNA ژنومی، DNA پلاسمیدی یا حتی محصول یک واکنش PCR دیگر باشد. معمولاً حدود یک نانو گرم از DNA پلاسمیدی یا یک میکروگرم از DNA ژنومی برای یک واکنش PCR کافی است. بیش از این مقدار باعث تولید محصولات غیر اختصاصی و مقدار کم نمونه نیز باعث کاهش دقت واکنش PCR یا عدم تکثیر قطعه مورد نظرمی گردد.

۳-۳-۶-۳-۲- آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت: استقامت Taq پلی مراز یکی از اصول ضروری در واکنش PCR می باشد. این آنزیم در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و در بافر مخصوص، چهار dNTP را طبق توالی رشته DNA الگو به یکدیگر متصل می کند. این آنزیم‌ها با الگو قرار دادن رشته اصلی و با استفاده از مونومرهای داکسی نوکلئوتیدی تری فسفات ساخت زنجیره پلی نوکلئوتیدی را سرعت می‌بخشند. آنزیم DNA پلیمراز با شناسایی گروه هیدروکسیل (OH) آزاد انتهای ´۳ در پرایمر، نوکلئوتیدها را به ترتیب ارائه شده از روی زنجیره DNA الگو به زنجیره جدید متصل می‌نماید و یک رشته مکمل DNA الگو می‌سازد.

۳-۳-۶-۳-۳- سیستم بافری: کلیه مراحل واکنش PCR، در محیط بافری صورت می گیرد. متداولترین بافرPCR که همراه با آنزیم Taq پلی مراز استفاده می شود حاوی غلظت ۱۰ برابر بوده که قبل از استفاده به نسبت (۱:۱۰) رقیق می شود.

۳-۳-۶-۳-۴- کاتیونهای دو ظرفیتی: همه DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت برای انجام فعالیت خود به کاتیونهای دو ظرفیتی آزاد (Mg^{+2}) نیاز دارند. منیزیم کاتیونی است که به پلیمراز متصل می شود و یک کوفاکتور ضروری برای فعالیت این آنزیم است.

۳-۳-۶-۳-۵- پرایمرها (آغازگرها): پرایمرها، الیگو نوکلئوتیدهای سنتزی کوتاه با طول معمولاً ۱۵ تا ۳۰ نوکلئوتید هستند که مکمل توالی مشخصی در ژنوم ارگانیسم مورد نظر می باشند و به عنوان محلی برای شروع فعالیت DNA پلی مراز عمل می کنند. پرایمر های PCR، به صورت کاملاً

اختصاصی و مکمل ناحیه مورد نظر DNA هدف، طراحی می گردند. با توجه به این که سایر ترکیبات مورد نیاز برای تمامی واکنش های PCR نسبتاً مشترک می باشد. لذا توالی پرایمرها عامل مهمی است که موجب تکثیر اختصاصی قطعه مورد نظر می شود.

مهمترین کار درتکنیک PCR انتخاب قطعه ژنی مناسب و طراحی پرایمر مناسب جهت جداسازی و تکثیر ژن 16S rRNA در LAB با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک می‌باشد که بعد از طراحی پرایمر، ژن مربوطه Blast می‌شود تا اختصاصی بودن وجود ژن در سویه محرز شود (جامی الاحمدی و افضل جوان، ۱۳۹۶).

در این تحقیق برای یک جفت پرایمر FORWARD و REVERSE تکنیک PCR انجام شد: PCR برای بررسی جنس باکتری های اسید لاکتیک گرم مثبت با پرایمرهای یونیورسال[1] (جدول ۳-۱) صورت گرفت.

جدول ۳-۱ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن 16S rRNA

نام پرایمر	توالی 5′ ⟶ 3′	T_M°
27FYM	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	64°C
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	61°C

۳-۳-۶-۳-۶- داکسی نوکلئوتید تری فسفات: داکسی نوکلئوتید تری فسفات ها واحدهای سازنده DNA همانند سازی شده در طی واکنش PCR هستند. معمولاً مقادیر مساوی از هر چهار نوع dNTP (dATP، dTTP، dGTP ، dCTP) و با غلظت‌های مساوی ۰/۲ میلی مولار از هر یک در مخلوط واکنش مورد استفاده قرار می گیرد، در غیر این صورت دقت PCR کاهش خواهد یافت (جامی الاحمدی و افضل جوان، ۱۳۹۶).

[1] Universal

امروزه برای انجام واکنش PCR از PCR Master Mix استفاده می شود. این ماده یک محلول آماده مصرف برای انجام واکنش PCR است. تنها مواد لازم برای انجام PCR با کمک این مستر میکس، پرایمرها، نمونه های DNA و آب مقطر است.

ویژگی های مهم این محلول عبارتست از: کاستن از زمان انجام کار، حذف آلودگی های احتمالی، افزایش صحت انجام کار.

در این مستر میکس dNTP، سیستم بافری آمونیومی، منیزیم کلراید و پایدار کننده موجود است. برای یک واکنش PCR ۲۰ میکرولیتری تنها ۱۰ میکرولیتر از این مستر میکس مورد نیاز است. مستر میکس مورد استفاده محصول .Pishgam Biotech CO بود.

جدول۳-۲: حداقل تجهیزات مورد نیاز آزمایشگاهی برای انجام واکنش PCR

تجهیزات عمومی	تهیه معرف ها	تهیه نمونه	هنگام PCR	بعد از PCR
یخچال فریزر -۲۰°C سمپلر متغیر Work Station (اتاقک کاری) ظروف پلاستیکی یا شیشه ای مناسب	میکرو سانتریفوژ ورتکس دستگاه تهیه آب مقطر یخ ساز ترازو pH متر سمپلر متغیر سر سمپلر دستکش	میکروفیوژ ورتکس هود لامینار دستکش لاتکس بدون پودر سمپلر متغیر سر سمپلر	دستگاه ترموسایکلر	تانک الکتروفورز مایکروویو سیستم مشاهده ژل سیستم عکسبرداری از ژل منبع برق

۳-۳-۶-۳-۷- اجزای واکنش PCR :

اجزای نهایی واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر است که شامل: ۲ میکرو لیتر DNA الگو، ۱۰ میکرولیتر Master Mix، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (دونوع پرایمر پیشرو و معکوس)، ۶ میکرولیتر آب مقطر استریل می باشد که در زیر هود لمینار با هم مخلوط شد.

دستگاه ترمو سایکلر: مهمترین جزء از تجهیزات آزمایشگاهی مورد نیاز است که برای ایجاد دماهای مختلف در مدت زمان مورد نظر قابل برنامه ریزی است و کار واکنش زنجیره پلی مراز و فراوان سازی ژنوم به عهده این دستگاه می باشد.

پس از تهیه نمودن شرایط PCR، جهت تکثیر ژن‌ها، مخلوط واکنش ذیل (PCR mixture) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه گردید (جدول ۳-۳) و با استفاده از سیکل حرارتی ذکر شده در جدول ۳-۴، در دستگاه ترموسایکلر که پروتکل آن برای مراحل مختلف تنظیم گردید، انتقال داده شد و انجام PCRبا درجه حرارت و زمان مناسب برای تکثیر ژن‌ها انجام گرفت.

جدول ۳-۳: اجزاء مخلوط واکنش برای PCR با حجم کلی ۲۰ میکرولیتر

Material	Concent	Tube NO. (ul)
PCR Master Mix	-	10µl
PrimerF	10 Pmol	1µl
PrimerR	10 Pmol	1µl
Template	ng/µl	2µl
D.D.w		6µl
Total		20µl

جدول۳-٤: سیکل حرارتی واکنش PCR باDNA ژنومیک

Stage	.Program NO	Temeprature	Time	Cycle NO.
Initial Denaturation	1	95 ºC	5 min	1
Denaturation Annealing Extention	2	94 ºC 54 ºC 72 ºC	30s 30s 2 min	33
Final Extention	3	72 ºC	10min	1
Cooledtime	4	12 ºC	10min	∞

شکل ۳-۵: نمایی از سیکل PCR در مراحل مختلف

۳-۳-۶-۴- تفکیک قطعات تکثیر یافته پس از PCR

به منظور تعیین این که محصول PCR به درستی تکثیر شده است یا خیر، نیاز به مشاهده محصولات تکثیر می باشد. این کار با استفاده از فرآیند الکتروفورز روی ژل انجام گردید. بافر (TBE 1x) را به مقدار مورد نیاز در داخل تانک الکتروفورز ریخته و سینی حاوی ژل را درون تانک قرار دادیم. به کمک سمپلر مقدار ۲ میکرولیتر از مارکر را با احتیاط و به آرامی در داخل یکی از چاهک‌های ژل ریختیم به نحوی که مارکر کاملاً در داخل چاهک بنشیند. سپس مقدار ۲µl از محلول بافر لودینگ را به وسیله سمپلر با ۱۰µl از محصول PCR خوب مخلوط کرده و آن را به آرامی و با احتیاط در داخل چاهک ژل ریختیم (علت اختلاط بافر این است که نمونه ها به راحتی در چاهک ها قرار بگیرند). محصولات PCR باید کاملاً در داخل چاهک بنشیند و از آن خارج نشوند. سپس از لدر[1] ۳µl تزریق گردید. در پایان، درب تانک را بسته و آن را به منبع تغذیه وصل نمودیم. منبع تغذیه الکتریکی را روشن کرده و آن را روی ولتاژ مناسب تنظیم شد. ولتاژ بالاتر موجب جداسازی سریعتر نمونه ها می شود اما موجب ذوب شدن ژل و بافر نیز می گردد و ولتاژ پایین تر میتواند موجب پهن شدن باندها برای قطعات کوچک DNA شود. ولتاژ بایستی در بازه ۸۰-۱۲۰ تنظیم شود (در این تحقیق برای انجام الکتروفورز از ولتاژ ۸۰ استفاده شده است).

همانطور که ذکر شد، طی بارگذاری نمونه ها یک مارکر DNA که به لدر نیز معروف است نیز در چاهک جداگانه ای افزوده شد. این مارکر حاوی قطعاتی از مولکول DNA با وزن های مشخص است که برای تخمین وزن مولکول های DNA مورد استفاده قرار می گیرد. اجزاء بر اساس بار خود تحت اثر یک میدان الکتریکی به سمت کاتد یا آند مهاجرت می کنند. با حرکت مولکولهایی با طول های مختلف، باندهای مجزا در ژل تشکیل می شود. از آن جایی که DNA بار منفی دارد در طی ژل به سمت بار مثبت حرکت می کند. محل وجود DNA درون ژل به طور مستقیم بوسیله رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تعیین گردید.

---

[1] Ladder

در تهیه ژل از آگارز، جهت الکتروفورز قطعات کوچک DNA و نیز به عنوان بافر تانک الکتروفورز از TBE (1X) استفاده شد. بافر TBE (5X) - Tris-Boric acid-EDTA در این پژوهش استفاده شد (خریداری شده از شرکت سینا ژن). این بافر حاوی TRIS به میزان ۵۴ گرم، EDTA ۰/۵ مولار به مقدار ۲۰ میلی لیتر و Boric acid به میزان ۲۷/۵ گرم بوده که با آب مقطر استریل به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانیده شد، سپس بافر اتوکلاو شده، مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۳-۶-۴-۱- ژل آگارز ۱٪: برای بررسی کیفیت DNA از ژل آگارز ۱٪ (w/v) استفاده شد. آگارز ۱٪ قادر به تفکیک قطعات ۱۰۰bp تا ۱۰۰۰bp است. در غلظت‌های بالاتر آگارز، قطر منافذ ریزتر است. برای تهیه آگارز ۱٪، ۰,۷ گرم پودر آگارز شرکت سیناژن در ۷۰ میلی لیتر بافر TBE (1X) حل کرده و به مدت ۱/۵ دقیقه در مایکروویو قرار دادیم تا شفاف شود. بعد از سرد شدن تا دمای ۵۵°c- ۶۰ به آگارز مذاب به میزان ۲µl معرف رنگی اتیدیوم بروماید اضافه نمودیم. یک شانه[1] در سینی[2] مخصوص ژل گذاشته شد تا چاهک مورد نیاز برای بارگذاری نمونه در ژل ایجاد شود. به محلول آگارز زمان داده شد تا کمی سردتر شود و سپس در قالب ریخته شد (تا ضخامت حدود ۵ میلی متر). بعد از بستن ژل شانه به طور عمودی از سینی خارج شد به گونه‌ای که چاهک‌های ژل آسیب نبیند، سپس ژل درون محفظه بافری قرار گرفت. مقدار بافر موجود در محفظه باید به حدی باشد که روی ژل را بپوشاند.

۳-۳-۶-۴-۲- رنگ بارگذاری[3]: یک مایع ویسکوز محتوی رنگ (برای مشاهده آسان حرکت DNA) و سوکروز، فایکول یا گلیسرول (برای سنگین کردن قطعات و باقی ماندن در چاهک) می باشد. حجم کوچکی از محصول PCR به رنگ افزوده شد و توسط پیپت با رنگ مخلوط گردید و در چاهک با میکرو سمپلر بار گذاری شد.

---

[1] Comb
[2] Tray
[3] Loading dye

۳-۳-۶-۴-۳- لودینگ بافر[1] 6X: لودینگ بافر برای ایجاد دانسیته و رنگ بر روی DNA به کار می‌رود و باعث می‌شود به راحتی داخل چاهک‌های ژل لود شود. همچنین این محلول به طور طبیعی بار منفی دارد، بنابراین مانند DNA در یک مسیر حرکت می‌کند و این امکان را می‌دهد که در پایان فرآیند توسط دستگاه ترانس لومیناتور تحت نور ماوراء بنفش قطعات DNA قابل رویت باشند (جامی الاحمدی و افضل جوان، ۱۳۹۶).

در مرحله بعد منبع نیرو روشن شد. نمونه ها تا زمانی که به نزدیکی انتهای ژل برسند الکتروفورز می شوند. سپس ژل از محفظه خارج، رنگ آمیزی و با دستگاه ترانس لومیناتور عکس برداری شد و با نرم افزارQuantum ST4 مورد مشاهده قرار گرفت.

۳-۳-۷- رنگ آمیزی و عکس برداری از ژل آگارز:

محصول PCR جدا شده روی ژل آگارز با چشم قابل مشاهده نمی باشد، به منظور مشاهده محصول ژل باید با یک رنگ فلورسنت به نام اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شود. مولکول های اتیدیوم بروماید مسطح هستند و میتوانند بین جفت بازهای DNA دو رشته ای وارد شوند. وقتی این اتفاق می افتد این مولکول ها منظم شده و شکل مرتبی به خود می گیرند و می توانند تحت نور ماوراء بنفش نور فلورسنت ایجاد کنند. بعد از رنگ آمیزی و قرار گرفتن ژل در معرض UV باندهای نارنجی مایل به صورتی در مکان هایی که DNA وجود دارد به صورت درخشان قابل مشاهده هستند (جامی الاحمدی و افضل جوان، ۱۳۹۶).

جدول۳-۵: راهنمای عکس لوازم و دستگاههای بکار رفته در الکتروفورز

A	B	C	D	E	F	G
ژل آگارز	**بافرTBE**	**بافرلودینگ**	**منبع تغذیه**	**الکتروفورز**	**دستگاه ترانس لومینار**	**نرم افزار عکس**

[1] . DNA Loading Dye

شکل ۳-۶ مواد و دستگاههای بکار رفته در ژل الکتروفورز

۳-۳-۸- ارسال جهت توالی یابی

سویه ها در میکرو تیوپ های ۱/۵ میلی لیتری به همراه دو پرایمر مستقیم و معکوس (با غلظت های پیکو مول بر میکرولیتر) در حجم های ۵۰ میکرولیتر، برای توالی یابی به شرکت سیناژن ارسال گردید.

۳-۳-۹- نرم افزارهای بیو انفورماتیکی

با دریافت توالی های مورد نظر، با استفاده از نرم افزار Codon Code Aligner همردیفی چند تایی انجام شد برای باکتری های اسید لاکتیک مورد تجزیه قرار گرفته و گروه بندی به عمل آمد. هم ردیف کردن مربوط به توالی یابی ژن 16S rRNA سویه ها با استفاده از برنامه بیوانفورماتیکی BLAST[1] در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت و ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از MEGA5 [2] انجام شد. در نهایت بر اساس اطلاعات موجود در بانک ژنی و و نتایج بررسی های مورفولوژیک شناسایی ایزوله های باکتریایی موجود، در سطح جنس و گونه انجام شد.

۳-۳-۱۰- تشخیص متابولیت ε- پلی ال لایزین و بررسی اثر ترکیبات محیط کشت روی میزان آن

۳-۳-۱۰-۱- تشخیص وجود ε- پلی ال لایزین (مرحله مقدماتی):

در مرحله اول از نمونه های باکتری های کشت یافته در محیط MRS مایع به محیط کشتی حاوی ۱۰ گرم گلیسرول، ۰/۱ عصاره مخمر، ۰/۶۸ گرم KH_2PO_4، ۰/۲۵ گرم MgSO4 ۷ آبه، ۰/۶۶ گرم $(NH_4)_2SO_4$ و ۰/۰۱ گرم $FeSO_4$ ۷ آبه که pH آن روی ۷ تنظیم گردید انتقال داده شد. این کار با اضافه کردن ۲٪ آگار برای ساخت محیط جامد تکرار شد. در مرحله بعد تلقیح متیلن بلو به میزان ۰/۰۰۲٪ به لوله های حاوی محیط مایع و پلیت های محیط جامد انجام شد و لوله ها و پلیت ها به

[1]Basic Local Alignment Search Tool
[2]Molecular Evolutionary Genetics Analysis

مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. بعد از این مدت لوله ها و پلیت هایی که بیرنگ گردید وارد مرحله دوم تست تکمیلی وجود ε - پلی ال لایزین شد.

۳-۳-۱۰-۲- تشخیص وجود ε- پلی ال لایزین (مرحله تکمیلی) و بررسی اثر ترکیبات محیط کشت:

در مرحله بعد محیط هایی حاوی اجزاء مشتمل بر گلوکز آن هیدراته، عصاره مخمر و $(NH_4)_2SO_4$ و پودر سویا (گلوکز و پودر سویا) با درصد های متفاوت تهیه گردید و در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید. سپس از جدایه dd01 که در مراحل قبلی نتایج قابل توجهی در خصوص تولید متابولیت مورد بررسی داشت به این ده ارلن تلقیح صورت گرفت. بعد تمامی محیط ها در شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۷۰ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز گرمخانه گذاری شد. (شکل ۳-۷)

و پس از این مدت طبق پروتکل زیر عملیات آماده سازی برای خواندن جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۸۰ نانومتر صورت گرفت:

۱) ۰/۰۰۲ گرم تریپان بلو در ml ۲ آب مقطر حل کردیم.

۲) از هر نمونه ml ۲ برداشته و در g۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نمودیم.

۳) ۲/۸ بافر فسفات به همراه ml ۱۲۰ تریپان بلو به هر فالکون اضافه کرده از نمونه سانتریفوژ شده از فاز روئی ml ۱ به آنها اضافه کردیم.

۴) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در بن ماری به مدت یکساعت انکوبه شد.

۵) از هر نمونه ml ۲ برداشته و در g۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نمودیم.

۶) در کووت ریخته با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج nm۵۸۰ خوانده شد.

شکل ۳-۷- تلقیح نمونه به محیط کشت با درصدهای متفاوت گلوکز و پودر سویا

در مرحله سوم نتایج اولیه بدست آمده در مدل RSM -Central Composite بررسی و آنالیز گردید.

۳-۳-۱۰-۳- طراحی ترکیبی توسط نرم افزار RSM

مقادیر اولیه منبع کربن (گلوکز) و منبع پروتئین (سویا) بر اساس نتایج مطالعات غربالگری قبلی مشخص گردید. توسط نرم افزار RSM از این دو متغیر ۱۰ سطح تهیه شد.

جدول ۳-۶: نسبت های پیشنهادی توسط نرم افزار RSM

نمونه	گلوکز	پودر سویا
۱	۲۵	۱۵
۲	۴۷/۵	۱۰/۵
۳	۲۵	۶
۴	۷۰	۱۵
۵	۷۹/۳۱۹۸۱	۱۰/۵
۶	۴۷/۵	۴/۱۳۶۰۳۹
۷	۴۷/۵	۱۰/۵
۸	۴۷/۵	۱۶/۸۶۳۹۶
۹	۷۰	۶
۱۰	۱۵/۶۸۰۱۹	۱۰/۵

پس از تهیه محیط کشت ها طبق نسبت های مشخص شده گلوکز و پودر سویا و افزودن ترکیبات پایه محیط کشت که در مرحله تکمیلی به آن اشاره شد در حجم های ۲۵ سی سی در ارلن تهیه و پس از تلقیح سویه میکروبی dd01 و انکوبه گذاری جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد و پاسخ های مشاهده شده در مدل RSM تحلیل و ارزیابی گردید.

فصل چهارم

نتایج و بحث

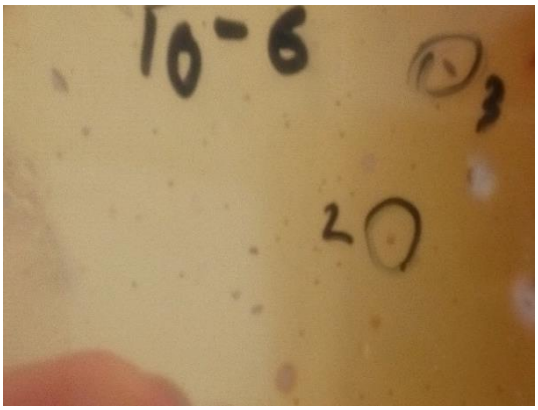
۴-۱- آماده سازی نمونه ها:

از بین نمونه های ماست، دوغ، پنیر، کشک خشک و کره کشت داده شده در محیط اختصاصی باکتری -های اسید لاکتیک تنها از نمونه های دوغ کالپوش، ماست و دوغ کلاته خیج قادر به جداسازی و ایزوله باکتری های اسید لاکتیک شدیم. در خصوص بقیه نمونه های سنتی با این که نتایج اولیه کشت مثبت بود اما بدلیل آلودگی شدید کلی فرمی، کپک و مخمر در مراحل بعدی کلنی های اسید لاکتیک در محیط MRS رشد نکرد.

در میان کلنی های رشد کرده در این سه محصول نیز با توجه به شکل مورفولوژی کلنی که گرد یا بیضی یا مخروطی بود از کلنی های مختلف عمقی نمونه برداری شد و در MRS مایع کشت انجام شد و چندین مرحله درMRS آگار کشت سطحی تا رسیدن به تک کلنی انتقال یافت.

۴-۲- باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از نمونه دوغ کلاته خیج

در پلیت کشت داده شده از دوغ کلاته خیج از نظر مورفولوژی (شکل۴-۱) سه نوع کلنی تشخیص داده شد که با حروف dd01,dd02, dd03 کدگذاری گردید:



شکل ۴-۱- کلنی های رشد یافته در پلیت با اشکال مورفولوژیکی متفاوت

۴-۲-۱- کد dd01

در این مرحله از تحقیق نمونه دوغ تا رقت $۱۰^{-۸}$ رقیق سازی شد، برآیند پلیت های رقت ۷ و ۸ طبق رابطه زیر (استاندارد ملی ایران، شماره ۸۲۴۸) که نشان دهنده تعداد باکتری ها است حاکی از آنست که در یک سی سی دوغ ۳×۱۰^{۸} باکتری مشاهده شد.

معادله (۱)

$$N = \frac{\sum C}{d\ (n_1 + 0/1 n_2)}$$

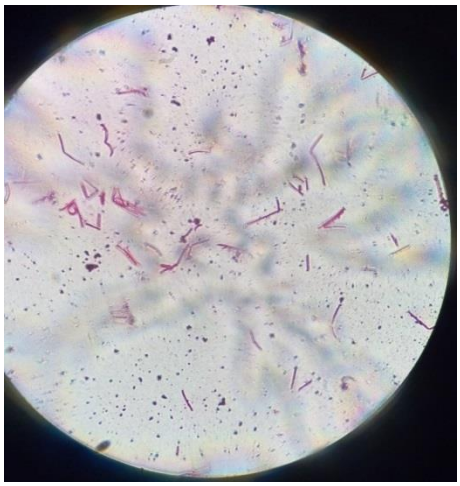
$\sum C$: مجموع کلنی های مشخص شمارش شده در تمامی پلیت ها

n_1 : تعداد پلیت ها در رقت اول

$n_۲$: تعداد پلیت ها در رقت دوم

d : فاکتور یا ضریب رقت مربوط به اولین رقت

شکل کلنی بیضی شکل بود. کلنی مشکوک به باکتری اسید لاکتیک از عمق آگار جداسازی شد و برای اطمینان تست های اولیه رنگ آمیزی افتراقی گرم انجام شد. بعد از رنگ آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ با عدسی با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده شد. نتایج نشان داد که گونه جداسازی شده گرم مثبت و میله ای بود (شکل ۴-۱). در مرحله بعد تست کاتالاز بر روی نمونه جدا شده انجام شد، با توجه به کاتالاز منفی بودن این امکان که گونه جدا شده باکتری اسیدلاکتیک می باشد تقویت شد.



شکل ۴-۲: تصویر رنگ آمیزی گرم کلنیdd01 استخراج شده از دوغ کلاته خیج

همان گونه که مشاهده می شود با توجه به شکل کلنی ها به نظر می رسد که لاکتوباسیلوس هستند.

۱- بررسی تولید اسید و گاز بر روی محیط قندی توسط dd01

در این مرحله از تحقیق از منابع قندی متفاوت شامل گلوکز، سوکروز، رافینوز، مالتوز، فروکتوز، نشاسته، لاکتوز، مانیتول، گالاکتوز، سوربیتول استفاده شد و گونه جدا شده بر روی قندهای انتخابی رشد داده شد و تولید اسید و گاز در نمونه ها جدا شده بررسی شد. نتایج نشان داد که گونه جدا شده بر روی هیچ منبع قندی تولید گاز نکرده و لوله درهام فاقد حباب هوا بود. و تنها بر روی منبع قندی نشاسته این گونه جدا شده اسید تولید نکرده و در اثر رشد گونه جدا شده بر روی سایر منبع قندی اسید تولید شد. از آنجا که افت pH توأم با تولید اسید، سبب افزایش فعالیت پروتئاز و آمیلاز می شود (Cul et al., 2005) در محیط های کشت کمپلکس که حاوی قندهای ساده می باشد تولید اسید حاصل از هیدرولیز مونوساکارید به افزایش فعالیت آمیلاز و هیدرولیز نشاسته کمک می کند اما در این محیط که تنها حاوی نشاسته است برای اکثر گونه ها رشد جزئی است یا متوقف می شود (زارعی یام و همکاران، ۲۰۱۲). با توجه به عدم تشکیل گاز می توان گفت باکتری مورد نظر هموفرمنتاتیو می باشد.

۲- بررسی تحمل شرایط اسیدی و نمک های صفراوی

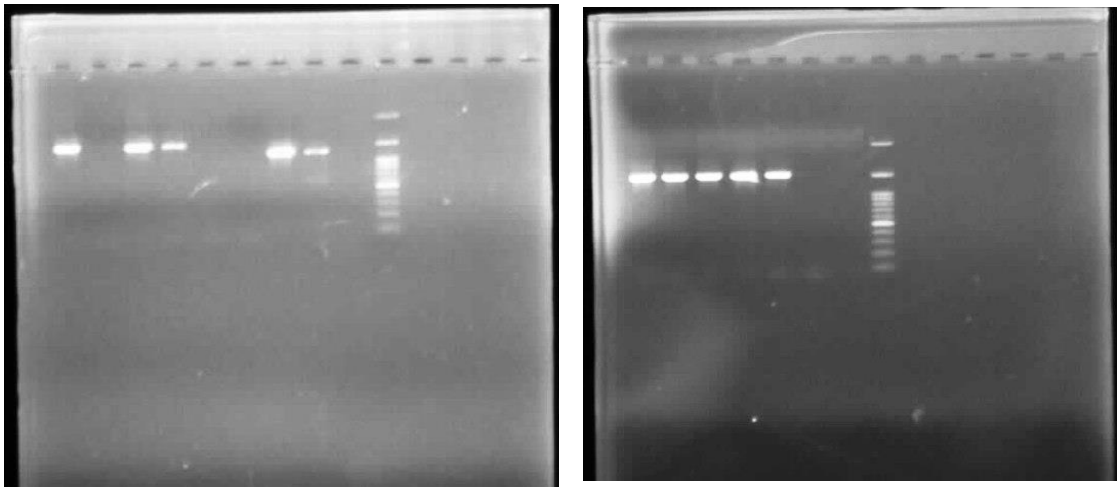
این گونه جدا شده بر روی محیط حاوی نمک صفراوی در سطح ۰/۲ درصد رشد کرده و افزایش سطح نمک به ۰/۳ درصد روی رشد به صورت محسوسی اثر کاهنده داشت. رشد در pH = ۵/۲ بیشتر از ۴/۵ و بیشتر از ۲/۵ بود اما با وجود ۲۳٪ زنده مانی می توان گفت با توجه به بالا بودن تعداد کلنی رشد یافته در پلیت ($۷*۱۰^{۷}$) این باکتری به طور بالقوه پتانسیل پروبیوتیک بودن را داراست.

رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قابل توجه بوده در حالی که در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد رشدی مشاهده نشد و در دمای ۴۴ درجه سانتی گراد نسبت به ۳۷ درجه سانتی گراد کلنی های کمتری رشد یافت و این کلنی ها ریزتر بودند. با توجه به نتایج آزمایشات بیوشیمیایی چنین تحلیل می شود که گونه جداسازی شده شباهت قابل توجه ای به لاکتوباسیلوس – دلبروکی دارد.

در تحقیق انجام شده توسط نریمانی وهمکاران (۲۰۱۳) روی شیر و ماست شهرستان خوی با استفاده از روشهای بیوشیمیایی ومورفولوژیکی و روش مولکولی و توالی یابی به نتایج مشابهی دست یافتند و باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی را جداسازی و شناسایی نمودند.

۳- تست ژنتیکی برای تشخیص گونه dd01

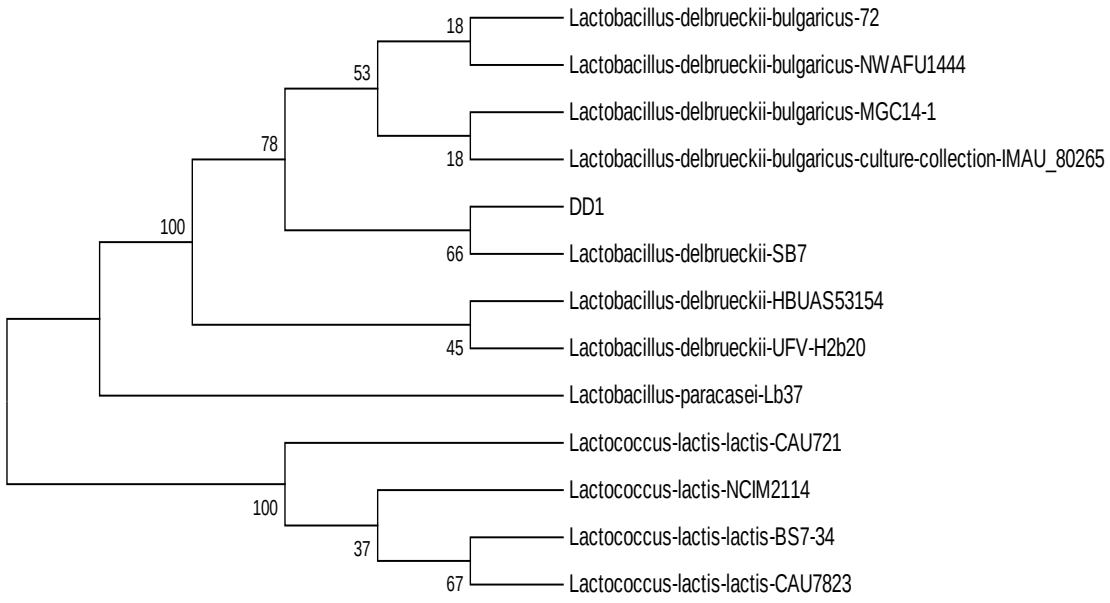
نمونه کلنی جدا شده dd01 در دوغ کلاته خیج بعد از خالص سازی در محیط کشت MRS مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد بعد از ۲۴ ساعت نمونه ها سانتیریفیوژ شده و محلول فوقانی جدا شده رسوب ته نشینی با آب استریل دو بار شستشو شده و بافت شسته شده با استفاده از کیت استخراج، DNA آن جدا سازی شد با نانو دراپ کیفیت و کمیت DNA استخراج شده بررسی شد و در غلظت بهینه با استفاده از کیت PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد و سپس به منظور اطمینان از درستی PCR با روش الکتروفورز مشاهده گردید (شکل ۴-۳).



شکل۴-۳: مشاهده ژل نمونه های DNA تکثیر شده پس از PCR

نتیجه blast توالی نوکلئوتیدی منطقه ریبوزومی در سایت NCBI نشان داد که گونه جدا شده شباهت قابل توجهی به Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain TW49-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence دارد.

پس از وارد کردن توالی ها در نرم افزار MEGA 5، هم تراز یا الاین شده و سپس درختچه فیلوژنتیکی آن با توجه به گونه های مشابه آن رسم گردید (شکل ۴-۴).



شکل۴-۴- درختچه فیلوژنتیکی گونه اسید لاکتیک باکتری جدا شده با ۱۲ گونه مشابه بر اساس آنالیز Nearest neighbor interchange منطقه 16s ریبوزومی (The bootstrap level : 1000 pseudo-replications)

درختچه فیلوژنتیکی نشان داد که گونه جدا شده با گونه باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکلی جدایه SB7 شباهت قابل توجه ای داشت.

دعوتی و حسامی (۲۰۱۸) طی بررسی دوغ گوسفندی عشایر ناحیه سومار به کمک روش های نسل جدید توالی یابی و مولکولی وابسته به کشت، توسط تکثیر ژن 16s rRNA با پرایمرهای یونیورسال 27F و 1492R و توالی یابی، نیز لاکتوباسیلوس دلبروکی را از آن جدا کردند که میکروارگانیسم غالب دوغ تشخیص داده شد. جامعه میکروبی دوغ گوسفندی بر پایه نسل جدید توالی یابی در سطح جنس به صورت ۹۴/۰۸٪ لاکتوباسیلوس نسبت به سایر جنس ها شناسایی شدند و در سطح گونه لاکتوباسیلوس دلبروکی ۵۱/۸۱٪ نسبت به سایر لاکتوباسیلوس ها شناسایی شد. در این مطالعه بیشترین فراوانی مربوط به لاکتوباسیلوس دلبروکی بود.

در مطالعه ای که Asmahan (۲۰۱۱)، بر روی جداسازی و شناسایی باکتری های اسید لاکتیک دوغ از منطقه خارطوم سودان انجام داد موفق به شناسایی گونه لاکتوباسیلوس دلبروکی به عنون گونه غالب گردید.

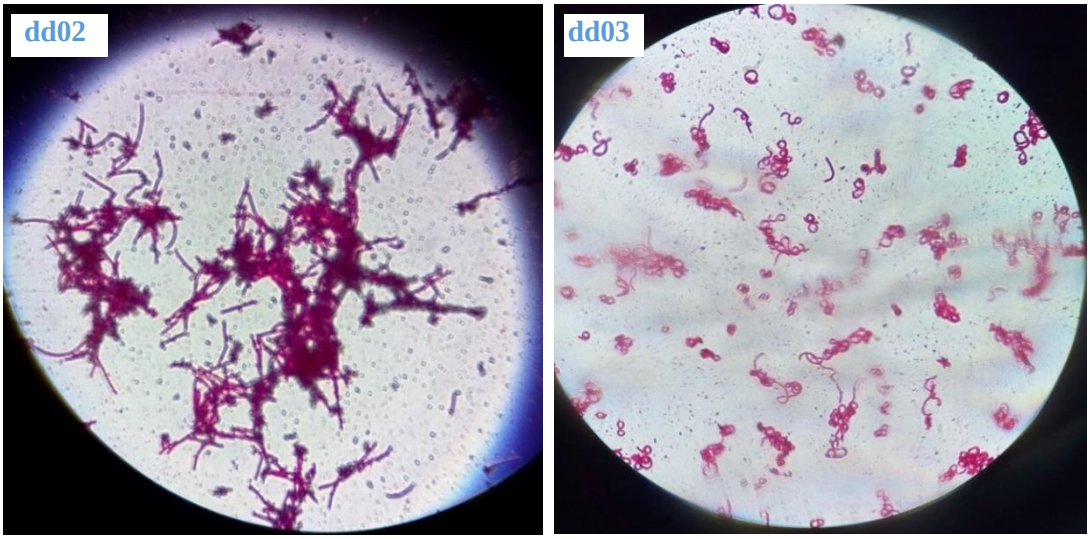
خان ناظر و آزاد نیا (۲۰۰۹)، در تحقیقی که در شناسایی باکتری های اسید لاکتیک دوغ انجام دادند، موفق به جداسازی گونه *Lactobacillus Delbrueckii Subsp Bulgaricus* شدند.

بدین ترتیب مشاهده می شود که نتایج بدست آمده از توالی یابی با نتایج حاصل از تست های بیو شیمیایی مطابقت دارد.

۴-۲-۲- کدهای dd02 و dd03

با توجه به این که در خصوص این نمونه ها تشابه در نتایج مشاهده گردید نتایج در یک بخش بررسی گردید. در این مرحله نیز نمونه دوغ تا رقت $۱۰^{-۸}$ رقیق سازی شد، تعداد باکتری های حاصل از کشت پس از بررسی در فرمولاسیون نشان داد که در یک سی سی دوغ $۵×۱۰^{۷}$ باکتری dd02 و $۵×۱۰^{۸}$ باکتری dd03 وجود دارد. همانطور که مشاهده می شود تعداد کلنی هایdd03 به میزان یک سیکل لگاریتمی بیشتر از dd02 می باشد.

شکل کلنی dd02 گرد و شکل کلنی dd03 بیضی یا مخروطی بود. کلنی مشکوک به باکتری اسید لاکتیک از عمق آگار جدا سازی شد و برای اطمینان تست های اولیه رنگ آمیزی افتراقی گرم انجام شد. بعد از رنگ آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ با عدسی با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده شد. نتایج نشان داد که گونه جداسازی شده گرم مثبت و میله ای بود (شکل ۴-۵). در مرحله بعد تست کاتالاز بر روی نمونه جدا شده انجام شد با توجه به کاتالاز منفی بودن این امکان که گونه جدا شده باکتری اسیدلاکتیک می باشد تقویت شد.



شکل۴-۵ : تصویر رنگ آمیزی گرم کلنی هایdd03,dd02 استخراج شده از دوغ کلاته خیج

چنانچه در تصاویر مشاهده می شود همان گونه که شکل کلنی با هم متفاوت بود شکل میکروسکوپی باکتری ها نیز تفاوت دارد. ولی در مجموع با توجه به شکل کلنی ها به نظر می رسد که لاکتوباسیلوس هستند.

۱- بررسی تولید اسید و گاز بر روی محیط قندی توسط dd02 و dd03

در این مرحله از تحقیق از منابع قندی مذکور استفاده شد و پروفایل تخمیر قندها و تولید گاز مشابه جدایه قبلی بود. با توجه به عدم تشکیل گاز می توان گفت باکتری مورد نظر همو فرمنتاتیو می باشد.

۲- بررسی تحمل شرایط اسیدی و نمک های صفراوی

رشد این باکتری ها روی نمک صفراوی نیز در سطح ۰/۲ درصد مشاهده شد و افزایش سطح نمک به ۰/۳ درصد روی رشد به صورت محسوسی اثر کاهنده داشت. رشد در pH = ۵/۲ بیشتر از ۴/۵ و بیشتر از ۲/۵ بود در جدایه dd02 ۱۸٪ زنده مانی مشاهده شد که هنوز هم با توجه به نسبتاً بالا بودن تعداد کلنی رشد یافته در پلیت (۶*۱۰^۶) این باکتری به طور بالقوه پتانسیل پروبیوتیک بودن را

داراست. در خصوص dd03 تعداد کلنی های رشد یافته در pH= ۲/۵ (۹*۱۰^۷) بود که همان ۱۸٪ زنده مانی مشاهده شد ولی برای این باکتری با توجه به بالاتر بودن تعداد کلنی های رشد یافته در این pH پروبیوتیک بودن آن محسوس تر است. دری و همکاران (۲۰۱۳)، در تحقیقی مشابه با بررسی فرآورده های لبنی شهرستان جهرم از ۵۰ نمونه لاکتوباسیل جدا شده (شامل ۱۱ گونه لاکتوباسیل تعیین هویت شده)، ۱۹ مورد دارای اثر بازدارندگی رشد علیه باکتری های پاتوژن سالمونلا تایفی موریوم، اشرشیاکلی و هلیکوباکتر پیلوری بود و بیشترین سویه شناسایی شده دارای اثر بازدارندگی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، لاکتوباسیلوس سالیواریوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی بودند که نشان دهنده دارا بودن خاصیت پروبیوتیکی این باکتری ها است.

در سال ۲۰۱۱ ، Sieladie و همکاران توانستند از میان ۴۱ جدایه لاکتوباسیلوس، ۱۸ سویه مقاوم به۲=pH را جداسازی نمایند. گزارش آنها حاکی بر این است که لاکتوباسیلوس های جدا شده از لبنیات، غلظت های ۰/۲ و ۰/۳٪ نمک های صفراوی را بخوبی تحمل می نمایند.

Tufile و همکاران (۲۰۱۱)، با جداسازی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس از ماست و تأثیر بازدارندگی از رشد روی باکتری هایی نظیر باسیلوس سابتیلیس، اشرشیاکلی، سالمونلا تایفی، ویبریو کلرآ و استافیلوکوکوس اورئوس و در نتیجه خاصیت پروبیوتیکی را ثابت نمودند.

Ercus (۲۰۰۷)، نشان داد که لاکتوباسیلوس بولگاریکوس جدا شده از محصول لبنی با تولید بولگاریکان (نوعی باکتریوسین) توانست تحت شرایط آزمایشگاهی جلوی رشد بسیاری از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی نظیر استافیلوکوک ها و کلستریدیوم را بگیرد که این نتایج، گواهی بر پتانسیل پروبایوتیکی این باکتری می باشد.

رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قابل توجه بوده در حالی که در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد رشد چندانی مشاهده نشد و در دمای ۴۴ درجه سانتی گراد نسبت به ۳۷ درجه سانتی گراد کلنی های کمتری رشد یافت و این کلنی ها ریزتر بودند. با توجه به نتایج آزمایشات بیوشیمیایی که با کلنی

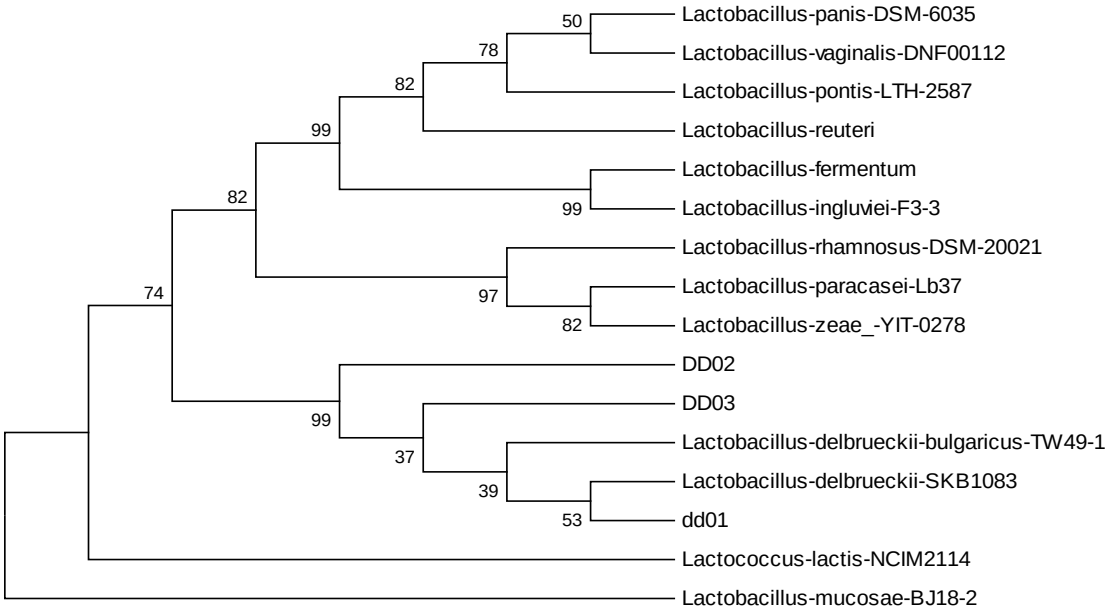
قبلی تفاوت چندانی مشاهده نشد چنین تحلیل می شود که این گونه ها نیز شباهت قابل توجه ای به لاکتوباسیلوس بولگاریکوس - دلبروکی دارد.

۳- تست ژنتیکی برای تشخیص گونه dd02 و dd03

نمونه کلنی جدا شده dd02 و dd03 در دوغ کلاته خیج بعد از خالص سازی در محیط کشت MRS مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد و استخراج DNA و بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده، در غلظت بهینه با استفاده از کیت PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد.

نتیجه blast توالی نوکلئوتیدی منطقه ریبوزومی در سایت NCBI نشان داد که گونه جدا شده با کد dd02شباهت قابل توجهی به Lactobacillus delbrueckii strain HBUAS53154 16S ribosomal RNA gene, partial sequence و گونه جدا شده با کدdd03 شباهت قابل توجهی به Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain NWAFU1424 16S ribosomal RNA gene, partial sequence دارد.

پس از وارد کردن توالی ها در نرم افزار MEGA 5، هم تراز یا الاین شده و سپس درختچه فیلوژنتیکی آن رسم گردید (شکل ۴-۶).



شکل۴-۶ : درختچه فیلوژنتیکی گونه اسید لاکتیک باکتری جدا شده با ۱۳ گونه مشابه بر اساس انالیز Nearest neighbor interchange منطقه 16s ریبوزومی (The bootstrap level : 1000 pseudo-replications)

درختچه فیلوژنتیکی نشان داد که گونه جدا شده با گونه باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی – زیر گونه بولگاریکوس جدایهTW49-1 شباهت قابل توجهی داشت.

بدین ترتیب مشاهده می شود که نتایج بدست آمده از توالی یابی با نتایج حاصل از تست های بیوشیمیایی کاملاً مطابقت دارد.

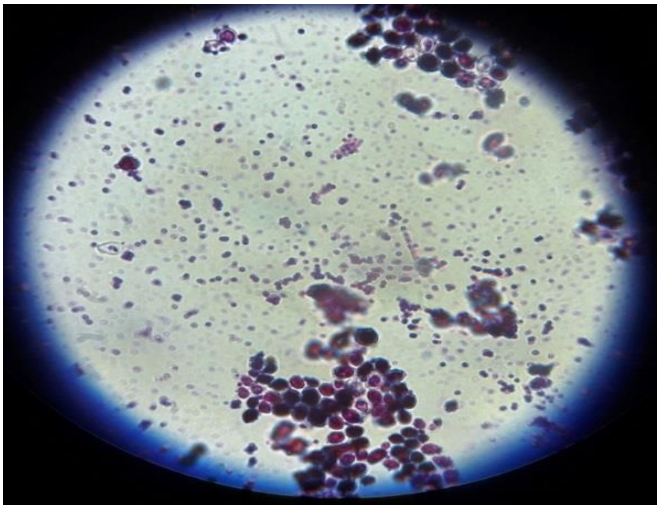
۴-۳- باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از نمونه دوغ کالپوش

در پلیت کشت داده شده از دوغ کالپوش از نظر مورفولوژی سه نوع کلنی تشخیص داده شد که با حروف dk01,dk02, dk03 کدگذاری گردید:

۴-۳-۱- کد dk01

این نمونه مربوط به دوغ کالپوش بود که در این مرحله نیز نمونه دوغ تا رقت $۱۰^{-۸}$ رقیق سازی شد، تعداد باکتری های حاصل از کشت پس از بررسی در فرمولاسیون نشان داد که در یک سی سی دوغ $۲×۱۰^{۸}$ باکتری dk01 وجود دارد.

شکل کلنی dk01 گرد ریز بود. کلنی مشکوک به باکتری اسید لاکتیک از عمق آگار جدا سازی شد و برای اطمینان تست های اولیه رنگ آمیزی افتراقی گرم انجام شد. بعد از رنگ آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ با عدسی با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده شد. نتایج نشان داد که گونه جداسازی شده گرم مثبت و کوکسی بود (شکل ۴-۷). در مرحله بعد تست کاتالاز بر روی نمونه جدا شده انجام شد با توجه به کاتالاز منفی بودن این امکان که گونه جدا شده باکتری اسیدلاکتیک می باشد تقویت شد.



شکل ۴-۷: تصویر رنگ آمیزی گرم کلنیdk01 استخراج شده از دوغ کالپوش

چنانچه در شکل فوق مشاهده می شود با توجه به شکل کلنی ها باکتری مورد نظر کوکسی است.

۱- بررسی تولید اسید و گاز بر روی محیط قندی توسط dk01

در این مرحله از تحقیق از منابع قندی مذکور استفاده شد، در خصوص تخمیر قندها علاوه بر نشاسته در محیط حاوی سوربیتول نیز اسید تولید نشد و یا تخمیر به مقدار بسیار جزئی صورت گرفت اما مشابه جدایه قبلی تولید گاز مشاهده نشد. با توجه به عدم تشکیل گاز می توان گفت باکتری مورد نظر هموفرمنتاتیو می باشد.

۲- بررسی تحمل شرایط اسیدی و نمک های صفراوی

رشد این باکتری ها روی نمک صفراوی نیز در سطح ۰/۲ درصد به صورت جزئی مشاهده شد و افزایش سطح نمک به ۰/۳ درصد روی رشد اثر بازدارنده داشت. رشد در pH =۵/۲ بیشتر از ۴/۵ و بیشتر از ۲/۵ بود در جدایهdk01 تعداد کلنی های رشد یافته در pH= ۲/۵ (۸*۱۰^{۵}) بود ٤٪ زنده مانی مشاهده شد که پروبیوتیک بودن آن را مشکوک می سازد.

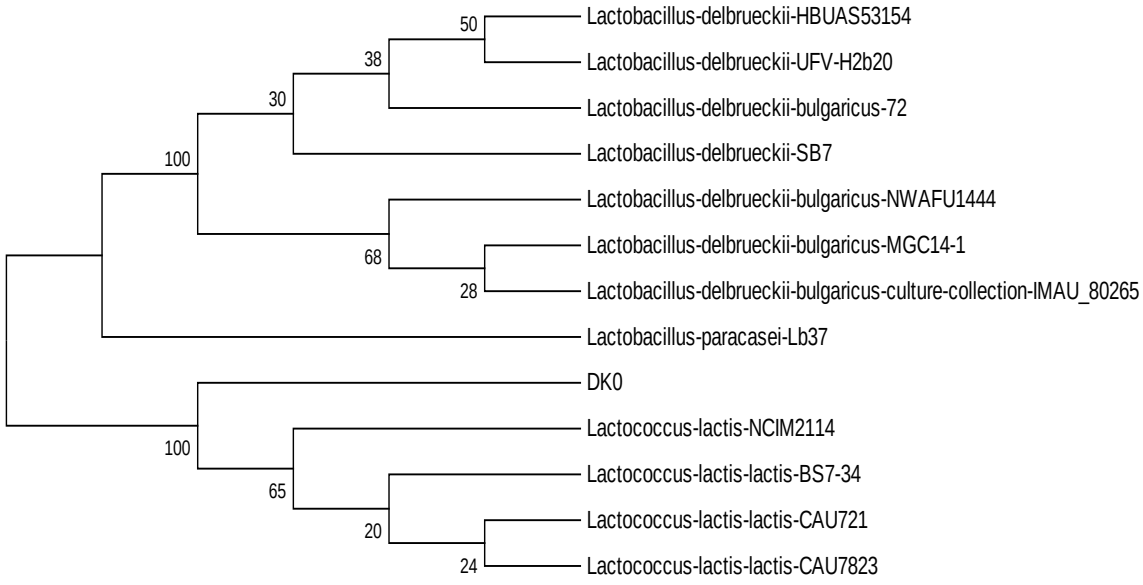
رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قابل توجه بوده در حالی که در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد رشد و تشکیل کلنی بازهم مشاهده شد و در دمای ۴۴ درجه سانتی گراد نسبت به دو دمای پیشین تعداد کلنی ها اندک و ریز بودند. با توجه به نتایج آزمایشات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی چنین تحلیل می شود که این گونه شباهت قابل توجه ای به لاکتوکوکوس لاکتیس دارد.

۳- تست ژنتیکی برای تشخیص گونه dk01

نمونه کلنی جدا شده dk01 در دوغ کالپوش بعد از خالص سازی در محیط کشت MRS مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد و استخراج DNA و بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده، در غلظت بهینه با استفاده از کیت PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد.

نتیجه blast توالی نوکلئوتیدی منطقه ریبوزومی در سایت NCBI نشان داد که گونه جدا شده با کد dk01شباهت قابل توجهی به Lactococcus lactis strain NCIM2114 16S ribosomal RNA gene, partial sequence دارد.

پس از وارد کردن توالی ها در نرم افزار MEGA 5، هم تراز یا الاین شده و سپس درختچه فیلوژنتیکی آن رسم گردید (شکل ۴-۸).



شکل۴-۸: درختچه فیلوژنتیکی گونه اسید لاکتیک باکتری جدا شده با ۱۲ گونه مشابه بر اساس انالیز Nearest neighbor interchange منطقه 16s ریبوزومی (The bootstrap level : 1000 pseudo-replications)

درختچه فیلوژنتیکی نشان داد که گونه جدا شده با گونه باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس جدایه NCIM2114 شباهت قابل توجهی داشت.

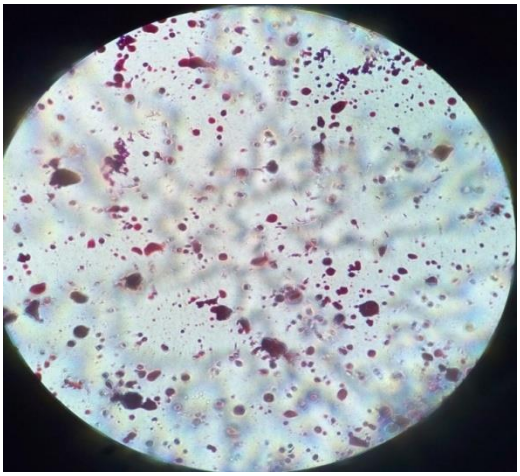
بدین ترتیب مشاهده می شود که نتایج بدست آمده از توالی یابی با نتایج حاصل از تست های بیو شیمیایی مطابقت دارد.

۴-۳-۲- نمونه با کد dk02

این نمونه نیز مربوط به دوغ کالپوش بود که در این مرحله نیز نمونه دوغ تا رقت $۱۰^{-۸}$ رقیق سازی شد، مجموع باکتری های حاصل از کشت در دو رقت متوالی ۷ و ۸ پس از محاسبه در فرمولاسیون نشان داد که در یک سی سی دوغ $۵×۱۰^{۷}$ باکتری dk02 وجود دارد.

شکل کلنی dk02 گرد درشت بود. کلنی مشکوک به باکتری اسید لاکتیک از عمق آگار جدا سازی شد و برای اطمینان تست های اولیه رنگ آمیزی افتراقی گرم انجام شد. بعد از رنگ آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ با عدسی با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده شد. نتایج نشان داد که گونه جداسازی شده گرم

مثبت و کوکسی بود (شکل۴-۹). در مرحله بعد تست کاتالاز بر روی نمونه جدا شده انجام شد با توجه به کاتالاز منفی بودن این امکان که گونه جدا شده باکتری اسیدلاکتیک می باشد تقویت شد.



شکل ۴-۹: تصویر رنگ آمیزی گرم کلنیdk02 استخراج شده از دوغ کالپوش

چنانچه در شکل فوق مشاهده می شود با توجه به شکل کلنی ها باکتری مورد نظر کوکسی است.

۱- بررسی تولید اسید و گاز بر روی محیط قندی توسط dk02

در این مرحله از تحقیق از منابع قندی مذکور استفاده شد، در خصوص تخمیر قندها علاوه بر نشاسته در محیط حاوی سوربیتول نیز اسید تولید نشد و یا تخمیر به مقدار بسیار جزئی صورت گرفت اما مشابه جدایه قبلی تولید گاز مشاهده نشد. با توجه به عدم تشکیل گاز می توان گفت باکتری مورد نظر همو فرمنتاتیو می باشد.

۲- بررسی تحمل شرایط اسیدی و نمک های صفراوی

رشد این باکتری ها روی نمک صفراوی نیز در سطح ۰/۲ درصد به صورت جزئی مشاهده شد و افزایش سطح نمک به ۰/۳ درصد روی رشد اثر بازدارنده داشت. رشد در pH = ۵/۲ بیشتر از ۴/۵ و

بیشتر از ۲/۵ بود در جدایه dk02 تعداد کلنی های رشد یافته در pH= ۲/۵ (۵*۱۰^۵) بود ۱/٤٪ زنده مانی مشاهده شد که پروبیوتیک بودن آن را دور از ذهن می سازد.

رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قابل توجه بوده در حالی که در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد رشد و تشکیل کلنی بازهم مشاهده شد و در دمای ۴۴ درجه سانتی گراد در پلیت رقت $۱۰^{-۵}$ تنها یک تک کلونی مشاهده شد که نشان دهنده توقف رشد در این دما است. با توجه به نتایج آزمایشات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی چنین تحلیل می شود که این گونه نیز شباهت قابل توجه ای به لاکتوکوکوس لاکتیس دارد.

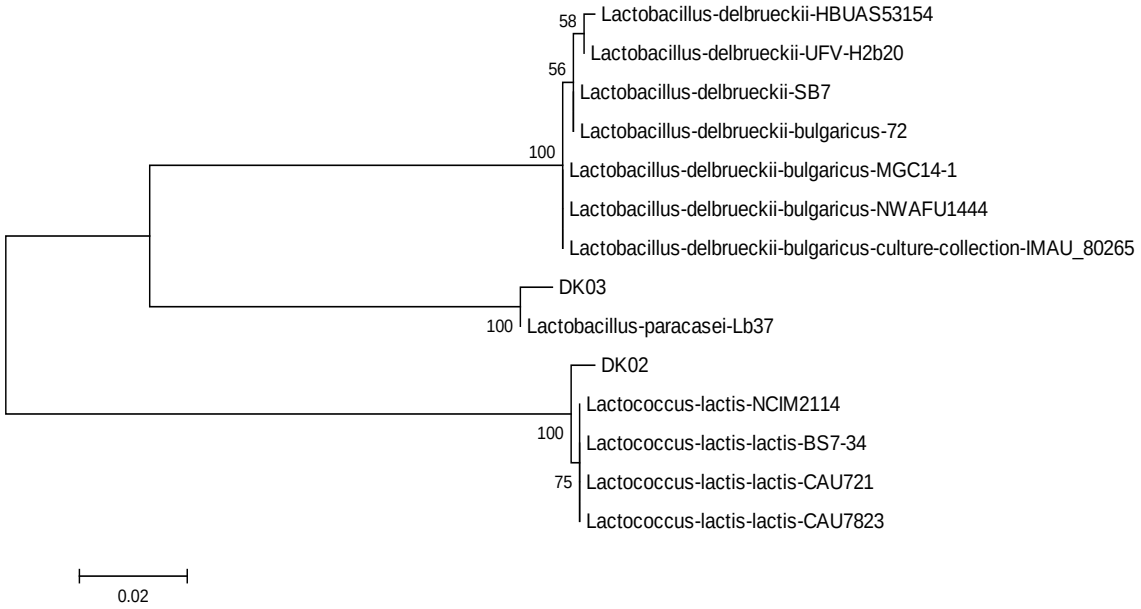
خان ناظر و آزاد نیا (۲۰۰۹)، از ۱۸ نمونه دوغ سنتی عشایر فارس با انجام تست های بیوشیمیایی قادر به جداسازی ۱۱۷ سویه از جنس لاکتوکوکوس لاکتیس شدند.

۳- تست ژنتیکی برای تشخیص گونه dk02

نمونه کلنی جدا شده dk02 در دوغ کالپوش بعد از خالص سازی در محیط کشت MRS مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد و استخراج DNA و بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده، در غلظت بهینه با استفاده از کیت PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد.

نتیجه blast توالی نوکلئوتیدی منطقه ریبوزومی در سایت NCBI نشان داد که گونه جدا شده با کد dk02شباهت قابل توجهی به Lactococcus lactis subsp. lactis strain 14B4 chromosome, complete genome دارد.

پس از وارد کردن توالی ها در نرم افزار MEGA 5، هم تراز یا الاین شده و سپس درختچه فیلوژنتیکی آن رسم گردید (شکل ۴-۱۰).



شکل۴-۱۰ : درختچه فیلوژنتیکی گونه اسید لاکتیک باکتری جدا شده با ۱۲ گونه مشابه بر اساس انالیز Nearest neighbor interchange منطقه 16s ریبوزومی (The bootstrap level : 1000 pseudo-replications)

درختچه فیلوژنتیکی نشان داد که گونه جدا شده با گونه باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس جدایه NCIM2114 شباهت قابل توجهی داشت.

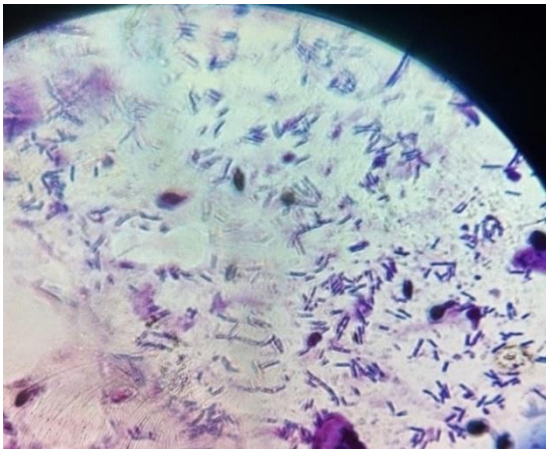
بدین ترتیب مشاهده می شود که نتایج بدست آمده از توالی یابی با نتایج حاصل از تست های بیو شیمیایی دارای مطابقت می باشد.

۴-۳-۳- نمونه با کد dk03

این نمونه نیز مربوط به دوغ کالپوش بود که در این مرحله نیز نمونه دوغ تا رقت $۱۰^{-۸}$ رقیق سازی شد، مجموع باکتری های حاصل از کشت در دو رقت متوالی ۷ و ۸ پس از محاسبه در فرمولاسیون نشان داد که در یک سی سی دوغ $۷×۱۰^{۶}$ باکتری dk03 وجود دارد.

شکل کلنی dk03 بیضی بود. کلنی مشکوک به باکتری اسید لاکتیک از عمق آگار جدا سازی شد و برای اطمینان تست های اولیه رنگ آمیزی افتراقی گرم انجام شد. بعد از رنگ آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ با عدسی با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده شد. نتایج نشان داد که گونه جداسازی شده گرم

مثبت و میله ای بود (شکل ۴-۱۱). در مرحله بعد تست کاتالاز بر روی نمونه جدا شده انجام شد با توجه به کاتالاز منفی بودن این امکان که گونه جدا شده باکتری اسیدلاکتیک می باشد تقویت شد.



شکل ۴-۱۱: تصویر رنگ آمیزی گرم کلنیdk03 استخراج شده از دوغ کالپوش

چنانچه در تصویر فوق مشاهده می شود با توجه به شکل کلنی ها باکتری مورد نظر لاکتوباسیلوس است.

۱- بررسی تولید اسید و گاز بر روی محیط قندی توسط dk03

در این مرحله از تحقیق از منابع قندی مذکور استفاده شد، در خصوص تخمیر قندها علاوه بر نشاسته در محیط حاوی سوربیتول و مانیتول نیز اسید تولید نشد اما به صورت جزئی به نظر می رسید که حباب گاز در لوله درهام ایجاد شده است. با توجه به تشکیل گاز به صورت جزئی و در محیط حاوی قند گلوکز به صورت محسوس تر چنانچه تحت تأثیر ترکیبات محیط کشت یا عوامل ثانویه نباشد می توان گفت ممکن است باکتری مورد نظر هتروفرمنتاتیو باشد.

سلیمانی فرد و همکاران (۲۰۱۴)، در پژوهش خود در خصوص غربال گری لاکتوباسیلوس های بومی ایران به نتایج مشابهی دست یافتند. در تحقیق انجام شده توسط آنها لاکتوباسیلوس پاراکازئی توانایی

تخمیر قندهای سلوبیوز، مانیتول و سوربیتول را نداشت. همچنین لاکتوباسیلوس پاراکازئی بر اساس تولید گاز از گلوکز جز هترو فرمنتاتیوهای اختیاری است.

۲- بررسی تحمل شرایط اسیدی و نمک های صفراوی

رشد این باکتری ها روی نمک صفراوی نیز در سطح ۰/۲ درصد به صورت جزئی مشاهده شد و افزایش سطح نمک به ۰/۳ درصد روی رشد اثر کاهنده داشت. رشد در pH =۵/۲ بیشتر از ۴/۵ و بیشتر از ۲/۵ بود در جدایهdk03 تعداد کلنی های رشد یافته در pH= ۲/۵ (۱*۱۰^۶) بود ۱٤/۲٪ زنده مانی مشاهده شد که پروبیوتیک بودن آن مشکوک به نظر می رسد.

رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قابل توجه بوده در حالی که در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد رشد کند ولی در دمای ۴۴ درجه سانتی گراد باز هم رشد و تشکیل کلنی مشاهده شد اما تعداد کلنی ها نسبت به که دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کاهش محسوسی داشت. با توجه به نتایج آزمایشات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی چنین تحلیل می شود که این گونه نیز شباهت قابل توجه ای به لاکتوکوکوس پارا کازئی دارد.

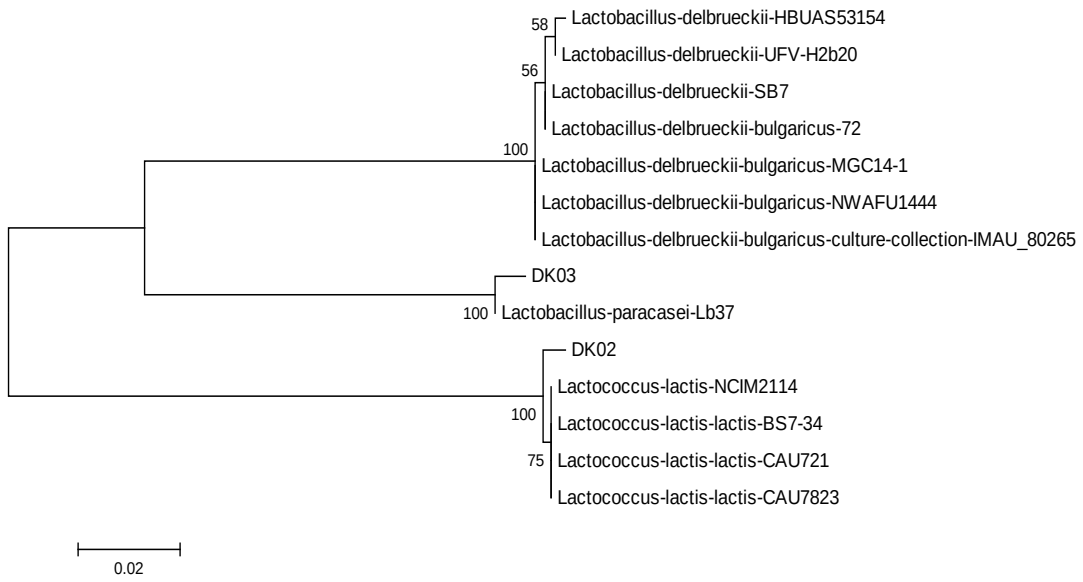
۳- تست ژنتیکی برای تشخیص گونه dk03

نمونه کلنی جدا شده dk03 در دوغ کالپوش بعد از خالص سازی در محیط کشت MRS مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد و استخراج DNA و بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده، در غلظت بهینه با استفاده از کیت PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد.

نتیجه blast توالی نوکلئوتیدی منطقه ریبوزومی در سایت NCBI نشان داد که گونه جدا شده با کد dk03شباهت قابل توجهی به Lactobacillus paracasei strain LOCK 0985 16S ribosomal

Lactobacillus rhamnosus strain BR4 16S ribosomal RNA , RNA gene, partial sequence gene, partial sequence دارد.

پس از وارد کردن توالی ها در نرم افزار MEGA 5، هم تراز یا الاین شده و سپس درختچه فیلوژنتیکی آن رسم گردید (شکل ۴-۱۲).



شکل۴-۱۲ : درختچه فیلوژنتیکی گونه اسید لاکتیک باکتری جدا شده با ۱۲ گونه مشابه بر اساس انالیز Nearest neighbor interchange منطقه 16s ریبوزومی (The bootstrap level : 1000 pseudo-replications)

درختچه فیلوژنتیکی نشان داد که گونه جدا شده با گونه باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی جدایه LB37 شباهت قابل توجهی داشت. بدین ترتیب مشاهده می شود که نتایج بدست آمده از توالی یابی با نتایج حاصل از تست های بیو شیمیایی مطابقت دارد.

۴-۴- باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از نمونه ماست کلاته خیج

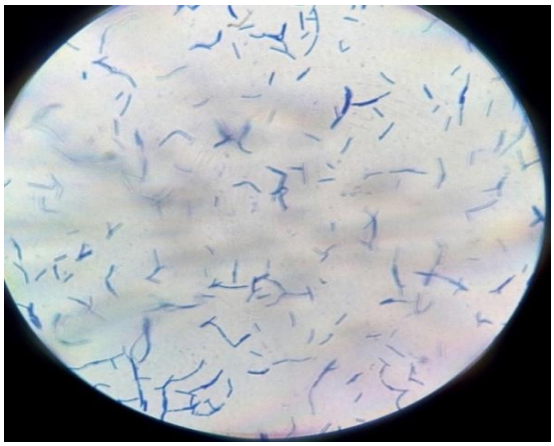
در پلیت کشت داده شده از نمونه ماست کلاته خیج از نظر مورفولوژی دو نوع کلنی تشخیص داده شد که با حروف MB02, MB03 کدگذاری گردید:

۴-۴-۱- نمونه با کد MB02

نمونه ماست تا رقت $۱۰^{-۸}$ رقیق سازی شد، مجموع باکتری های حاصل از کشت در دو رقت متوالی ۷ و ۸ پس از محاسبه در فرمولاسیون نشان داد که در یک گرم ماست $۱×۱۰^{۸}$ باکتری MB02 وجود دارد.

شکل کلنی MB02 گرد بود. کلنی مشکوک به باکتری اسید لاکتیک از عمق آگار جدا سازی شد و برای اطمینان تست های اولیه رنگ آمیزی افتراقی گرم انجام شد. بعد از رنگ آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ با عدسی با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده شد. نتایج نشان داد که گونه جداسازی شده گرم مثبت و میله ای بود (شکل ۴-۱۳). در مرحله بعد تست کاتالاز بر روی نمونه جدا شده انجام شد با توجه به کاتالاز منفی بودن این امکان که گونه جدا شده باکتری اسیدلاکتیک می باشد تقویت شد.

چنانچه در تصویر فوق مشاهده می شود با توجه به شکل کلنی ها باکتری مورد نظر لاکتوباسیلوس است.



شکل ۴-۱۳: تصویر رنگ آمیزی گرم کلنیMB02 استخراج شده از ماست کلاته خیج

۱- بررسی تولید اسید و گاز بر روی محیط قندی توسط MB02

در این مرحله از تحقیق از منابع قندی مذکور استفاده شد، باکتری مورد نظر قادر به تخمیر همه قندها بجز نشاسته و گالاکتوز بود، سوربیتول به میزان جزئی تخمیر شد. حباب گاز در لوله درهام به صورت ضعیف مشاهده شد. با توجه به تشکیل گاز می توان گفت ممکن است باکتری مورد نظر هترو فرمنتاتیو است.

۲- بررسی تحمل شرایط اسیدی و نمک های صفراوی

رشد این باکتری ها روی نمک صفراوی در سطح ۰/۲ درصد به میزان جزئی مشاهده شد و افزایش سطح نمک به ۰/۳ درصد روی رشد به طور محسوسی اثر بازدارنده داشت. رشد در pH =۵/۲ بیشتر از ۴/۵ و بیشتر از ۲/۵ بود در جدایه MB02 تعداد کلنی های رشد یافته در pH= ۲/۵ ($۲*۱۰^{۷}$) بود ۲۰٪ زنده مانی مشاهده شد که پتانسیل بالقوه پروبیوتیک بودن آن با توجه به تعداد بالا به نظر می رسد.

Dos Santus و همکاران در سال ۲۰۱۳ در تحقیقی روی سه جدایه لاکتوباسیلوس موکوسائی ایزوله شده از شیر بز، در خصوص پروبیوتیک بودن و مقاومت به شرایط اسیدی و نمک های صفراوی مطالعه کردند. این جدایه ها عبارت بودند از CNPC006, CNPC007, CNPC009. آنها در شرایط شبیه سازی شده معده و روده قرار گرفتند که هر سه جدایه مقاومت خوبی را به این شرایط نشان دادند و زنده مانی نزدیک ۵۰٪ داشتند و در این میان لاکتوباسیلوس موکوسائی CNPC007 بهترین نتیجه را به نمک های صفراوی نشان داد. بر اساس این نتایج عنوان کردند سه جدایه لاکتوباسیلوس موکوسائی قابلیت برگزیده شدن برای مطالعات بیشتر در خصوص پتانسیل پروبیوتیکی را دارا می باشند (Dos Santus,et al., 2013).

De Moraes و همکاران در سال ۲۰۱۷ به بررسی سه جدایه CNPC006, CNPC007, CNPC009 لاکتوباسیلوس موکوسائی با روش های ژنتیکی و بررسی های توالی ژنها و مقاومت به شرایط شبیه سازی شده پرداختند. آنها نیز جدایه CNPC007 را در مقایسه با سویه های دیگر ثبت کردند و عنوان کردند که این جدایه به عنوان یک پروبیوتیک امیدوار کننده برای استفاده در محصولات لبنی، مستحق مطالعات بیشتر برای تایید و کشف پتانسیل آن است (De Moraes,et al., 2017).

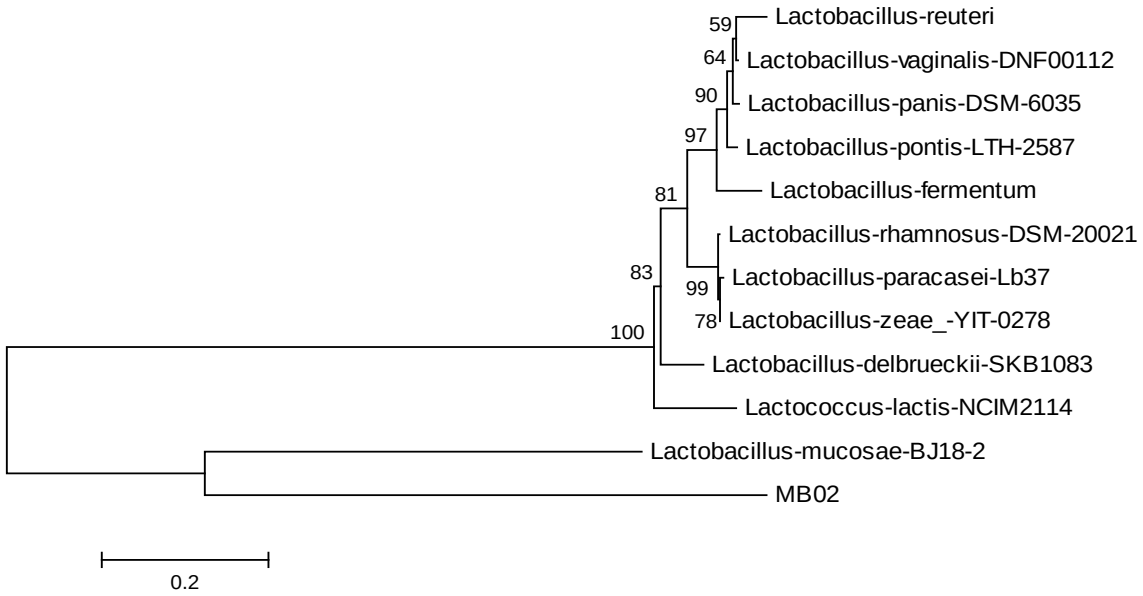
رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قابل توجه بوده در حالی که در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد رشد کند بود، ولی در دمای ۴۴ درجه سانتی گراد باز هم رشد و تشکیل کلنی مشاهده شد اما تعداد کلنی ها نسبت به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کاهش محسوسی داشت. با توجه به نتایج آزمایشات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی چنین تحلیل می شود که این گونه نیز شباهت قابل توجه ای به لاکتوکوکوس موکوسائی دارد.

۳- تست ژنتیکی برای تشخیص گونه MB02

نمونه کلنی جدا شده MB02 در ماست کلاته خیج بعد از خالص سازی در محیط کشت MRS مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد و استخراج DNA و بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده، در غلظت بهینه با استفاده از کیت PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد.

نتیجه blast توالی نوکلئوتیدی منطقه ریبوزومی در سایت NCBI نشان داد که گونه جدا شده با کد MB02شباهت قابل توجهی به Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain IMAU94251 16S ribosomal RNA gene, partial sequence دارد.

پس از وارد کردن توالی ها در نرم افزار MEGA 5، هم تراز یا الاین شده و سپس درختچه فیلوژنتیکی آن رسم گردید (شکل۴-۱۴).



شکل۴-۱۴: درختچه فیلوژنتیکی گونه اسید لاکتیک باکتری جدا شده با ۱۱ گونه مشابه بر اساس آنالیز Nearest neighbor interchange منطقه 16s ریبوزومی (The bootstrap level : 1000 pseudo-replications)

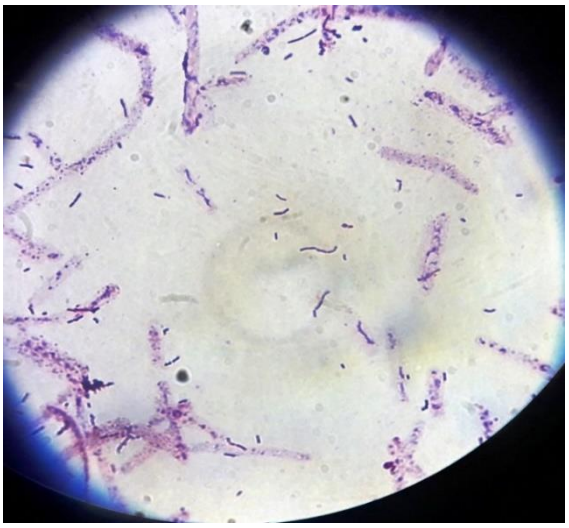
درختچه فیلوژنتیکی نشان داد که گونه جدا شده با گونه باکتری لاکتوباسیلوس موکوسائی جدایه BJ18- 2 شباهت قابل توجهی داشت.

بدین ترتیب مشاهده می شود که نتایج بدست آمده از توالی یابی با نتایج حاصل از تست های بیو شیمیایی مطابقت دارد.

۴-۴-۲- نمونه با کد MB03

نمونه ماست تا رقت $۱۰^{-۸}$ رقیق سازی شد، مجموع باکتری های حاصل از کشت در دو رقت متوالی ۷ و ۸ پس از محاسبه در فرمولاسیون نشان داد که در یک گرم ماست $۲×۱۰^{۸}$ باکتری MB03 وجود دارد.

شکل کلنی MB03 بیضی بود. کلنی مشکوک به باکتری اسید لاکتیک از عمق آگار جدا سازی شد و برای اطمینان تست های اولیه رنگ آمیزی افتراقی گرم انجام شد. بعد از رنگ آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ با عدسی با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده شد. نتایج نشان داد که گونه جداسازی شده گرم مثبت و میله ای بود (شکل۴-۱۵). در مرحله بعد تست کاتالاز بر روی نمونه جدا شده انجام شد با توجه به کاتالاز منفی بودن این امکان که گونه جدا شده باکتری اسیدلاکتیک می باشد تقویت شد.



شکل ۴-۱۵: تصویر رنگ آمیزی گرم کلنیMB03 استخراج شده از ماست کلاته خیج

چنانچه در تصویر فوق مشاهده می شود با توجه به شکل کلنی ها باکتری مورد نظر لاکتوباسیلوس است.

۱- بررسی تولید اسید و گاز بر روی محیط قندی توسط MB03

در این مرحله از تحقیق از منابع قندی مذکور استفاده شد، باکتری مورد نظر قادر به تخمیر همه قندها بجز نشاسته بود، حباب گاز در لوله درهام مشاهده نشد. با توجه به عدم تشکیل گاز می توان گفت ممکن است باکتری مورد نظر همو فرمنتاتیو است.

۲- بررسی تحمل شرایط اسیدی و نمک های صفراوی

رشد این باکتری ها روی نمک صفراوی در سطح ۰/۲ درصد مشاهده شد و افزایش سطح نمک به ۰/۳ درصد روی رشد به طور محسوسی اثر کاهنده داشت. رشد در pH =۵/۲ بیشتر از ۴/۵ و بیشتر از ۲/۵ بود در جدایه MB03 تعداد کلنی های رشد یافته در pH= ۲/۵ ($٤*١٠^{٧}$) بود ٪٤٠ زنده مانی مشاهده شد که پتانسیل بالقوه پروبیوتیک بودن آن به نظر می رسد.

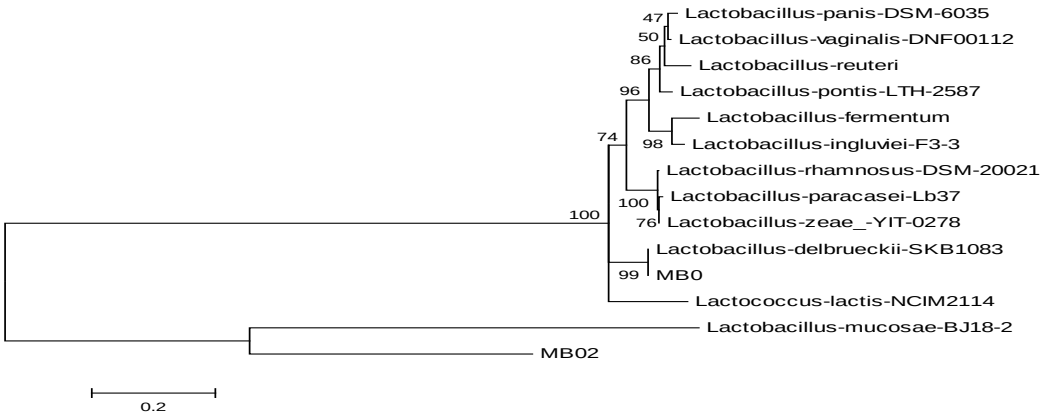
رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قابل توجه بوده در حالی که در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد رشد کند بود، ولی در دمای ۴۴ درجه سانتی گراد باز هم رشد و تشکیل کلنی مشاهده شد اما تعداد کلنی ها نسبت به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کاهش محسوسی داشت. با توجه به نتایج آزمایشات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی چنین تحلیل می شود که این گونه نیز شباهت قابل توجه ای به لاکتوکوکوس بولگاریکوس - دلبروکی دارد.

۳- تست ژنتیکی برای تشخیص گونه MB03

نمونه کلنی جدا شده MB03 در ماست کلاته خیج بعد از خالص سازی در محیط کشت MRS مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد و استخراج DNA و بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده، در غلظت بهینه با استفاده از کیت PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد.

نتیجه blast توالی نوکلئوتیدی منطقه ریبوزومی در سایت NCBI نشان داد که گونه جدا شده با کد MB02شباهت قابل توجهی به Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain IMAU94251 16S ribosomal RNA gene, partial sequence دارد.

پس از وارد کردن توالی ها در نرم افزار MEGA 5، هم تراز یا الاین شده و سپس درختچه فیلوژنتیکی آن رسم گردید (شکل ۴-۱۶).



شکل۴- ۱۶: درختچه فیلوژنتیکی گونه اسید لاکتیک باکتری جدا شده با ۱۲ گونه مشابه بر اساس انالیز Nearest neighbor interchange منطقه 16s ریبوزومی (The bootstrap level : 1000 pseudo-replications)

درختچه فیلوژنتیکی نشان داد که گونه جدا شده با گونه باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی جدایه SKB1083 شباهت قابل توجهی داشت. .

بدین ترتیب مشاهده می شود که نتایج بدست آمده از توالی یابی با نتایج حاصل از تست های بیو شیمیایی مطابقت دارد.

۴-۵- جست و جو و شناسایی ε - پلی ال لایزین

ε - پلی ال لایزین (ε-PL) از ۲۵ تا ۳۰ واحد ال لایزین تشکیل شده است. یک بیوپلیمر طبیعی است که در صنعت غذا و دارو استفاده می شود. این ترکیب روی طیف وسیعی از باکتری های گرم منفی، مثبت، قارچ ها و مخمرها دارای ویژگی آنتی میکروبی می باشد (Shima et al. 1984).

این ترکیب در آب حل شده، بدون اثر سمی می باشد (Shih et al. 2004, 2006). در کره، ژاپن و امریکا به طور وسیعی استفاده می شود و منبع گلوکز مهمترین سوبسترا برای تولید ε–PL از گونه های *Streptomyces albulus S 410* (Kahar et al. 2001), *Streptomyces albulus IFO 14147* (Shih et al. 2006) *and Kitasatospora sp. MY5.36* (Zhang et al. 2010). در این کشورها می باشد. استرپتومایسس مهمترین منبع تولید ε - پلی ال لایزین می باشد. *Streptomyces albulus*

مهمترین گونه مولد ε - پلی ال لایزین می باشد (Shima and Sakai 1977, 1981a, b; Shima et al. 1984).

تحقیقات نشان می دهد که در pH پایین تر در مرحله رشد محرک تولید ε - پلی ال لایزین است. با توجه به اهمیت ε - پلی ال لایزین در این مرحله از تحقیق با در نظر گرفتن تحقیقات اولیه انجام شده نشان داد که واریته dd01 (که نتایج درختچه فیلوژنتیکی و تست های بیوشیمیایی نشان داد که به گونه لاکتوباسیلوس دلبروکلی جدایه SB7 شباهت قابل توجه ای داشته) توانایی قابل توجهی در تولید ε - پلی ال لایزین دارد.

۴-۵-۱ بهینه سازی به روش آماری سطح پاسخ

آزمایش های بهینه سازی، بدست آوردن یک مدل ریاضی برای پیش بینی رفتار فرآیند می باشد. طرح های بهینه سازی از عوامل کمتری نسبت به طرح های معمولی برخوردار بوده ولی این عوامل شدیداً تاثیر گذار می باشند (Strobel, et al., 1999). روش سطح پاسخ یک روش آماری برای طراحی آزمایشات، ارزیابی تاثیر فاکتورهای مختلف و یافتن شرایط اپتیمم برای بازده مطلوب می باشد و به طور وسیعی برای بهینه سازی شرایط کشت و پارامترهای دیگر استفاده می شود (Urkut, et al., 2007). از آنجایی که هدف از این مرحله در تحقیق حاضر افزایش میزان تولید پلی ال لایزین می باشد، بازه ای از دو ترکیب کلیدی منبع کربن (گلوکز) و منبع نیتروژن (پودر سویا) انتخاب گردید (جدول ۴-۱) و میزان این دو ترکیب به منظور افزایش تولید پلی ال لایزین به روش آماری RSM بهینه شد.

جدول ۴-۱: میزان واقعی و کد شده متغیرهای غیر وابسته در روش آماری RSM

عامل	سطح				
	-۱/٤١٤٢	-۱	۰	۱	۱/٤١٤٢
گلوکز (گرم در لیتر)	۱۵/۸	۲۵	٤۷/۵	۷۰	۷۹/۵
پودر سویا(گرم در لیتر)	٤۵/۸۵	٦	۱۰/۵	۱۵	۱٦/۸

همانطور که از جدول ۴-۱ مشخص است اثرات خطی پودر سویا و گلوکز در میزان پلی ال لیزین در محیط، کشت، معنی‌دار می‌باشند. ($P < 0.01$) اثرات متقابل گلوکز - پودر سویا برای مقدار ε - پلی ال لایزین در توده زیستی معنی‌دار نمی‌باشند ($P > 0.01$) در مورد اثر درجه دوم بر تولید ε - پلی ال لایزین پودر سویا معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.01$). معادله ۱ مدل رگرسیون را برای ε - پلی ال لایزین در محیط کشت پس از تجزیه و تحلیل نتایج توسط نرم‌افزار Design expert نشان می‌دهد. مقدار عددی ضریب تعیین (R^2) برای فرمول ε - پلی ال لایزین ۰/۹۳ نشان‌دهنده میزان انطباق داده‌ها در مدل رگرسیون می‌باشد و می‌توان چنین نتیجه گرفت که مدل رگرسیون بخوبی توانسته است رابطه بین شرایط کشت (گلوکز و پودر سویا) و تولید ε - پلی ال لایزین را نشان داده و پیش‌بینی کند. همچنین مدل نهایی دارای عدم تطابق غیر معنی‌دار است که نشان دهنده بر ارزش خوب مدل می باشد. جدول ۴-۲ ضریب‌های رگرسیون و مقادیر p را برای مدل رگرسیون نشان می‌دهد.

جدول ۴-۲- پارامترهای ANOVA برای مدل ε - پلی ال لایزین (A گلوکز و B پودر سویا)

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربع	f	P
	ε - پلی ال لایزین	ε - پلی ال لایزین	ε - پلی ال لایزین	ε - پلی ال لایزین
مدل	۵	۲۶۰۱/۶۱۷	۱۰/ ۶۸۸۶۸	۰/۰۱۹۸
A-گلوکز	۱	۷۵۳۲/۴۷	۳۰/۹۴۶۹۷	۰/۰۰۵۱
B-پودر سویا	۱	۳۷۱۷/۹۲۷	۱۵/۲۷۵۰۱	۰/۰۱۷۴
AB	۱	۲۳۱/۶۴۸۴	۰/۹۵۱۷۲۲	۰/۳۸۴۵
A^2	۱	۵/۲۶۴۴۴۵	۰/۰۲۱۶۲۹	۰/۸۹۰۲
B^2	۱	۱۱۷۳/۱۲۲	۴/۸۱۹۷۴۱	۰/۰۹۳۱
باقی‌مانده	۴	۲۴۳/۳۹۹۳		
عدم تطابق	۳	۳۲۴/۵۳۲۴	۱۰/۸۱۱۶۸	۰/۱۱۹۱
خطای خالص	۱	۰,۰۵		

میزان R^2 برای فرمول رگرسیون مربوط به ε - پلی ال لایزین ۰/۹۳ می باشد.

همانطور که در جدول ۴-۲ مشاهده می شود میزان f گلوکز از پودر سویا بالاتر می باشد که نشان دهنده تاثیر قابل توجه این سوبسترای کلیدی در تولید ε - پلی ال لایزین می باشد. طرح مرکب مرکزی روش سطح پاسخ به همراه میزان واقعی داده ها در جدول ۴-۳ گزارش شده است. همانطور که در جدول ۴-۳ دیده می شود با افزایش میزان سویا میزان ε - پلی ال لایزین کاهش یافته است و همچنین با ثابت نگه داشتن میزان سویا و افزایش میزان گلوکز میزان ε - پلی ال لایزین کاهش یافته است. جدول ۳- ۴ نشان می دهد که در سطح پایین گلوکز (۲۵ گرم در لیتر) افزایش سطح پروتئین پودر سویا از ۶ به ۱۵ گرم در لیتر میزان گاماپلی ال لیزین از ۱۹۰ به ۱۲۹ پی پی ام کاهش یافت (نمونه ۱و ۳). در سطوح ثابت سویا به عنوان منبع نیتروژنی افزایش منبع کربنی (گلوکز) کاهش قابل توجه ای در میزان ε - پلی ال لایزین ایجاد نشده است (نمونه ۱ و ۴، نمونه ۲ و ۵). چنین تحلیل می شود که افزایش منبع نیتروژنی و منبع کربنی باعث کاهش تولید ε - پلی ال لایزین می شود.

جدول ۴-۳: طراحی آزمایش ها و نتایج از دو متغیر اعمال شده بر روی پاسخ در روش RSM

			Ɛ - پلی ال لایزین	Ɛ - پلی ال لایزین
نمونه	گلوکز	پودر سویا	پاسخ مشاهده شده	پاسخ پیش بینی شده
۱	۲۵	۱۵	۱۲۹/۷۸	۱۲۹/۷۸
۲	۴۷/۵	۱۰/۵	۱۲۹/۷۸	۱۲۹/۷۸
۳	۲۵	۶	۱۹۰	۲۰۴
۴	۷۰	۱۵	۱۰۰	۱۰۰/۰۹
۵	۷۹/۳۱۹۸۱	۱۰/۵	۸۰	۸۴/۲۰
۶	۴۷/۵	۴/۱۳۶۰۳۹	۱۹۸/۳۱	۱۹۲/۳۰۶
۷	۴۷/۵	۱۰/۵	۱۲۹	۱۳۱/۱
۸	۴۷/۵	۱۶/۸۶۳۹۶	۱۴۰	۱۳۱/۳۱
۹	۷۰	۶	۱۲۹/۷۸	۱۲۹/۷۸
۱۰	۱۵/۶۸۰۱۹	۱۰/۵	۱۸۹/۹۴	۱۷۵

ضریب مدل چند جمله ای درجه دوم پس از تجزیه و تحلیل توسط نرم افزار و حذف عبارت‌های غیرمعنی دار توسط روش Forward در نرم افزار بدست آمد و نتیجه حاصل معادله (۲) می باشد.

معادله (۲)

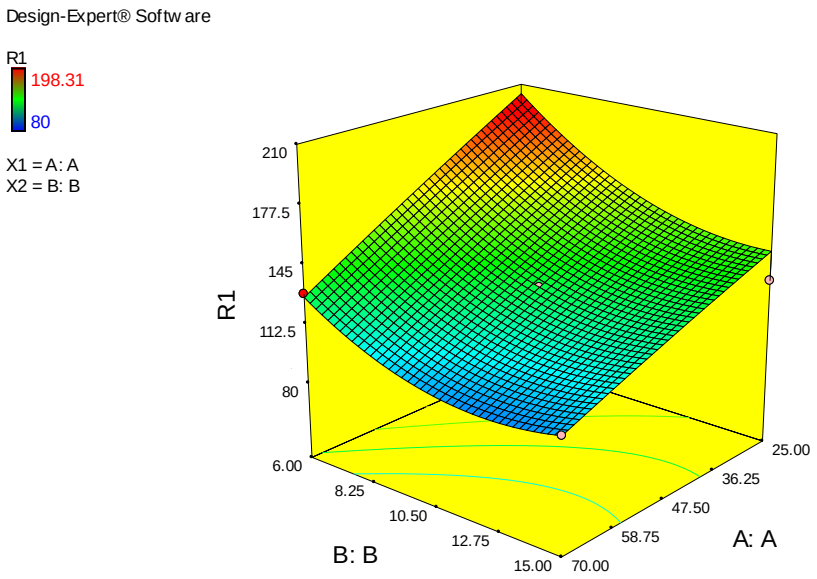
$$P = 364.78 - 1.95\times A - 24.97 \times B + 7.55\times10^{-2} (A \times B) - (2.12\times10^{-3}) \times A^2 + (7.9\times10^{-1}) \times B^2$$

میزان P مربوط به میزان Ɛ - پلی ال لایزین به پی پی ام می باشد. A و B به ترتیب مربوط به میزان گلوکز و پودرسویا بر حسب گرم در لیتراست.

۴-۵-۲- نتایج میزان Ɛ - پلی ال لایزین

نمودار ۴-۱۷ تاثیر سطوح مختلف گلوکز و پودر سویا را بر میزان Ɛ - پلی ال لایزین نشان می‌دهد. سطح پاسخ نشان می دهد که هرچه میزان پودر سویا و گلوکز افزایش یابد میزان Ɛ - پلی ال لایزین کاهش می یابد. بیشترین مقدار Ɛ - پلی ال لایزین در غلظت گلوکز (۲۵g/l) و پودر سویا (۶ g/l)

بدست می آید. تحقیقات وسیعی نشان داده که ترکیبات محیط کشت تاثیر قابل توجه ای در تولید ε - پلی ال لایزین دارد. Guo و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر روی بهینه سازی تولید ε - پلی ال لایزین از گونه *Streptomyces diastatochromogenes* به روش سطح پاسخ تحقیقی انجام دادند نتایج نشان داد که گلوکز منبع کربنی مناسبی برای تحریک ε - پلی ال لایزین می باشد غلظت بهینه گلوکز ۶۰ گرم در لیتر گزارش شد میزان بهینه ε - پلی ال لایزین در این تحقیق ۰/۹ گرم در لیتر گزارش شد.



نمودار ۴-۱۷: منحنی RSM برای تولید ε - پلی ال لایزین (پی پی ام) به وسیله ی گونه باکتری با متغیرهای گلوکز (A) و پودر سویا (B)

۴-۵-۳- مقادیر بهینه پیش بینی شده توسط مدل درجه دوم برای متغیرها

مقادیر بهینه پیش بینی شده با استفاده از نرم افزار Design Expert برای متغیر های گلوکز (A) و پودر سویا (B) به منظور تولید حداکثری پلی ال لیزین به ترتیب ۲۶/۰۳ و ۶/۲۸ گرم در لیتر می باشد میزان محصول ۱۹۹/۲۲ پی پی ام پیش بینی شد. در حالی که مقادیر پیش بینی شده برای تولید حداقلی ε - پلی ال لایزین (۹۴/۹۸ پی پی ام) برای متغیرهای گلوکز (A) و پودر سویا (B) به ترتیب ۷۰ و ۱۲/۴۶ گرم در لیتر می باشد.

۴-۵-۴- ارزیابی مدل رگرسیون تولید ε - پلی ال لایزین

به منظور ارزیابی مدل، شرایط پیش بینی شده مدل تولید ε - پلی ال لایزین اعمال گردید. محیط کشت مناسب تولید ε - پلی ال لایزین حاوی ۲۶/۰۳ و ۶/۲۸ گرم در لیتر گلوکز و پودر سویا بود و pH اولیه ۵/۵ تنظیم شد. پس از ۳ روز تخمیر میزان ε - پلی ال لایزین ۲۰۵ پی پی ام بدست آمد که با نتایج پیش بینی شده از فرمول که میزان ۱۹۹/۲۲ پی پی ام بود نزدیکی قابل توجهی دارد. میزان خطا ۰/۲۹ درصد می باشد که نشان دهنده انطباق میزان پیش بینی شده نتایج با میزان واقعی می باشد.

نتیجه گیری کلی:

در این پژوهش با توجه به اهمیت باکتری های اسید لاکتیک در سلامت انسان و کاربرد وسیع در صنعت غذا به شناسایی و جداسازی باکتری های بومی از لبنیات سنتی منطقه خاصی از کشور پرداخته شد.

استفاده از روش های فنوتیپی و تست های بیوشیمیایی روش خوبی برای شناسایی سویه ها در سطح گونه شناخته شد. به طوری که نتایج بدست آمده از یک مرحله به ارزیابی نتایج مراحل دیگر کمک قابل توجهی نمود. همچنین روش های مولکولی برای شناسایی دقیق تر در سطح گونه انجام شد. با پیشرفت های صورت گرفته در سطح مولکولی، تکنیک های ژنوتیپی زیادی به عنوان ابزاری برای شناسایی گونه ها بکار می رود. در مقایسه با روش های شناسایی فنوتیپی مزیت عمده روش های شناسایی بر اساس DNA، بالا بودن قدرت تفکیک و قابلیت اجرای آنها به صورت عمومی و همچنین تکرار پذیری آنها می باشد (Durme, et al., 2001).

نتایج توالی یابی در مورد ۸ سویه لاکتو باسیلوس و لاکتوکوکوس جدا سازی شده در این پژوهش حاکی از تشابه کامل توالی های مورد نظر با توالی های ژن 16S rRNA ثبت شده در بانک ژنی بود که شامل زیر گونه هایی از:

Lactobacillus Delbruckii SkB1083, Lactobacillus Delbruckii SB7, Lactobacillus ،*Lactococcus lactis-NCIM 2114* ،*Delbruckii bulgaricus TW49-1 Lactobacillus Paracasei Lb37*، *Lactobacillus Mocosae-BJ18-2* می باشند.

و همچنین نتایج به دست آمده از توالی یابی با نتایج حاصل از تست های بیوشیمیایی مطابقت دارد. با توجه به این که این سویه های شناسایی شده بومی دارای خواص پروبیوتیکی از جمله مقاومت به شرایط اسیدی معده و نمک های صفراوی می باشند می توان از این سویه ها به عنوان استارتر در محصولات لبنی صنعتی استفاده نمود.

در گام بعدی به شناسایی متابولیت ارزشمند Ɛ - پلی ال لایزین در جدایه ها پرداخته شد با توجه به آزمون های اولیه وجود Ɛ - پلی ال لایزین در نمونه دوغ کلاته خیج در جدایه های dd01,dd03 مثبت ارزیابی شد و میزان در جدایه dd01 به حدی بود که برای آزمایش قابل تأمل باشد. بعد از انجام اسپکتروفوتومتری و اطمینان از وجود این متابولیت با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی تغییر ترکیبات کلیدی محیط کشت (کربوهیدراتها و منابع نیتروژن) از طریق افزودن گلوکز و پودر سویا به محیط کشت پایه صورت گرفت. مدل سطح پاسخ نشان داد که هرچه میزان پودر سویا و گلوکز کاهش یابد، میزان Ɛ - پلی ال لایزین افزایش می یابد. بیشترین مقدار Ɛ - پلی ال لایزین در غلظت گلوکز (۲۶/۰۳ gr/l) و پودر سویا (۶/۲۸ gr/l) بدست آمد.

پیشنهادات

با توجه به شرایط اقتصادی و تحریم های فعلی و نیاز به خود کفائی ملی تحقیقات بسیاری در دانشگاه ها در خصوص شناسایی باکتری های اسید لاکتیک گردیده است اما کمتر کسی به دنبال جداسازی و ایزوله سازی باکتری شناسایی شده و لیوفیلیزه نمودن و تست باکتری جداشده حداقل در بخش R & D در صنعت کشور پرداخته است و تحقیقات این چنینی زمانی ارزشمند است که به کار گرفته شود و این میسر نمی گردد جز با گرد هم آیی و عزم ملی در این مهم، علی الخصوص که در حال حاضر یکی ار بیماری های عمده جامعه کنونی سرطان دستگاه گوارش است و با مصرف پروبیوتیک ها و علی

الخصوص باکتری هایی با پتانسیل تولید چنین متابولیت های ارزشمندی سلامت جامعه ارتقا یافته و همان گونه که بر همگان محرز است افکار بدیع در بدن های سالم به ظهور می رسند باشد که تحقیقات این چنینی جنبه صنعتی نیز پیدا کنند.

فصل پنجم

منابع

۵-۱- منابع

استاندارد ملی ایران، شماره ۱۱۸۸ (۱۳۸۴)، "کشک خشک- ویژگی ها"، تجدید نظر اول.

استاندارد ملی ایران، شماره ۱۶۲ (۱۳۹۵)، " کره پاستوریزه- ویژگی ها و روش های آزمون"، تجدید نظر ششم.

استاندارد ملی ایران، شماره ۲۴۵۳ (۱۳۸۷)، "دوغ ساده- ویژگی ها و روش های آزمون"، تجدید نظر دوم.

ایزدی م، فولادی م ح، شریفی سیرچی غ ر، امینی ج (۱۳۸۹)، "جداسازی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از نمونه های ماست شهرستان شهر بابک و شناسایی ملکولی آن"، مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، دوره ۲، شماره ۲، صفحه ۱-۱۲.

بهلولی خیاوی ر، اکبرزاده خیاوی ت ا، رخشیدن ز، نصیری ع، مدرس صدرانی ن، فرجی مزرعه خلفی ف (۱۳۹۵)، " مروری جامع و ضروری برPCR، انواع و کاربردهای آن، فصلنامه آزمایشگاه و تشخیص، شماره ۳، صفحه ۵۷-۶۸.

جامی الاحمدی خ، افضل جوان ف (۱۳۹۶)، "بهینه سازی کاربردی واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)" انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد صفحه ۱۲- ۱۶۶.

حاجی قاسمی م، مژگانی ن (۱۳۹۴) "شناسایی و بررسی خواص پروبیوتیکی باکتری های اسید لاکتیک بومی بر اساس ویژگی های فنوتیپی و ژنوتیپی"، مجله میکرو بشناسی پزشکی ایران، سال ۹ – شماره ۴– صفحه ۴۸-۵۴.

خان ناظر ع ح، آزاد نیا پ (۱۳۸۸)، " شناسایی و تعیین هویت لاکتیک اسید باکتری های جداشده از دوغ سنتی عشایر استان فارس"، مجله تحقیقات دامپزشکی ایران (دانشگاه شیراز)، دوره ۱۰، شماره ۳، صفحه ۲۳۵-۲۴۰.

خدابخش م، تاج آبادی ابراهیمی م، هاشمی م (۱۳۹۱)، " تولید اگزو پلی ساکارید از لاکتوباسیل های جدا شده از کشک منطقه لیقوان"، فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی، سال اول، شماره ۱، صفحه ۸۳-۱۰۰.

دری ک ا، نامدار ن، حمایت خواه جهرمی و (۱۳۹۲)، "جداسازی سویه های مختلف لاکتوباسیلوس ها از محصولات لبنی شهرستان جهرم و تاثیر متقابل آنها بر باکتری های مهم بیماری زای روده و معده"، مجله علوم آزمایشگاهی، دوره هفتم، صفحه ۲۲- ۲۸.

دعوتی ن، حسامی ش (۱۳۹۷)، " مقایسه تنوع میکروبی دوغ گوسفندی عشایر ناحیه سومار به کمک روش های نسل جدید توالی یابی و مولکولی وابسته به کشت"، مجله پژوهش های علوم و صنایع غذایی، سال چهاردهم، شماره پنجم.

دعوتی ن، زیبایی س (۱۳۹۴)، "جداسازی و شناسایی باکتریهای اسید لاکتیک دوغ شیر شتر تک کوهانه
ایرانی و بررسی خواص تکنولوژیکی آنها"، علوم و صنایع غذایی، شماره ۶۵، دوره ۱۴، صفحه ۳۱۱-۳۲۲.

رحمانی م ر، (۱۳۸۰)، " رابطه مصرف ماست با بیماری های اتوپیک"، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سال هفتم، شماره بیست و ششم، صفحه ۵۱- ۵۵.

رخ تابناک ن، خالقی م، ساسان ح ع (۲۰۱۵)، "جداسازی و شناسایی باکتری های لاکتوباسیلوس با پتانسیل پروبیوتیکی از لبنیات سنتی کرمان"، مجله میکرو بشناسی پزشکی ایران، سال ۱۰ ، شماره ۱، صفحه ۲۵- ۳۴.

زاهدی ه، فدائی نوغانی و، خلفی ل (۱۳۹۳)، " بررسی قابلیت زنده مانی باکتری های آغازگر در ماست غنی شده با فلاوونوئید و روغن استخراج شده از پوست پرتقال"، نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذائی، جلد ششم، شماره۲، صفحه ۹۷- ۱۱۴.

سرمست قهفرخی ا، مبینی دهکردی م، بهشتی مآل ک (۱۳۹۱)، "جداسازی و بررسی میزان تولید اسید لاکتیک در لاکتوباسیلوس های بومی استان چهارمحال و بختیاری جداسازی شده از محصولات لبنی "، فصلنامه علمی - پژوهشی زیست شناسی میکروارگانیسم ها، سال اول، شماره ۳، صفحه ۴۱-۵۲.

سعادت نوری م (۱۳۶۳)، "اصول نوین تغذیه در سلامتی و بیماری"، چاپ اول، انتشارات فرهنگ تهران.

سلیمانی فرد ف، قبادی دانا م، پیراوی ونک ز (۱۳۹۳)، " غربال گری لاکتوباسیل های بومی ایران از نظر تولید اسید لاکتیک و شناسایی سویه های برتر"، فصلنامه علمی- پژوهشی زیست شناسی میکرو ارگانیسم ها، سال چهارم، شماره ۱۵، صفحه ۱۵۵-۱۶۶.

سلیمی نمین ش، خمیری م، مقصود لو ی، میرزا نمدی ف (۱۳۹۳)، " جداسازی و شناسایی گونه های لاکتوباسیلوس از شیر خام و تعیین فعالیت اسیدی آنها"، نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، جلد هفتم، شماره اول، ۶۱-۷۶.

صمدی م (۱۳۹۷)، " مروری بر پلی ال لایزین به عنوان نگهدارنده طبیعی غذا"، دومین همایش ملی دانش و فناوری علوم کشاورزی، منابع طبیعی و محیط زیست ایران، تهران.
طاهرزاده م، اسماعیلی ا، ربانی م (۱۳۹۲)،" تولید گاما آمینوبوتریک اسید (GABA) به وسیله باکتری های اسیدلاکتیک"، مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره شانزدهم شماره ۸، صفحه ۴۶-۵۶.

طیب لقمانی ف، احسان دوست ا، فرهادیان ف (۱۳۹۲)، " اگزو پلی ساکاریدها ترکیباتی فراسودمند در بهبود خواص محصولات لبنی"، بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی.

ظفرمختاریان ا، رضازاده باری م، امیری ص، (۱۳۹۷)، " جداسازی و شناسایی مولکولی باکتریهای اسید لاکتیک تولید کننده اگزو پلی ساکارید از شیر و ماست گوسفندی" مجله علوم و صنایع غذایی شماره ۷۹، دوره ۱۵، صفحه ۲۴۳-۲۵۲.

عریان ش، یغمایی پ، زمانی ه (۱۳۸۹)، " تهیه و تولید ماست پروبیوتیکی با تلقیح سویه های لاکتوباسیلوس GG و مقایسه آن با ماست معمولی و تاثیر آنها در کاهش متابولیت های لیپیدی در سرم خون موش های صحرایی نر نژاد ویستار"مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی، دوره دوم، شماره پنجم، صفحه ۷-۱۲.
فرهنودی ف (ترجمه) بوخ کریستین سن (نویسنده)(۱۳۸۲)، " فن آوری تولید پنیر"، چاپ اول، شرکت سهامی شیر ایران (پگاه)، صفحه ۱.

قمری م (۱۳۸۸)، " معرفی اگزو پلی ساکاریدها و بهبود کیفیت مواد غذایی"، همایش منطقه ای غذا

و بیوتکنولوژی.

کفیلی ت، علی نسائی م (۱۳۹۶)، " شناسایی و بررسی گوناگونی ژنتیکی باکتری های اسید لاکتیک غیر آغازگر در پنیر رسیده تالشی"، مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی، دوره هفتم، شماره بیست و ششم.

کوزیکووسکی ف (۱۳۷۴)، " پنیر و فرآورده های شیری تخمیری"، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۱-۱۰۴.

محسنی م، " تکنیک ها در میکروبیولوژی"، چاپ اول، انتشارات دانشگاه مازندران.

مرتضوی س ع، خانی پور ا ، حسینی پرور س ه (۱۳۸۴)، " اطلس میکروبیولوژی مواد غذایی"، چاپ اول، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۸۵-۱۰۴.

مرتضوی س ع، کوچکی آ (مترجم) مایکل جی ویتز، نیل ال مورگان، گری هیگتون (نویسنده)(۱۳۸۳)، " مقدمه ای بر میکروبیولوژی صنعتی"، چاپ اول، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۵۵-۵۹.

مرتضویان ا. م، سهراب وندی س (۱۳۸۵)، " مروری بر پروبیوتیک ها و فرآورده های غذایی پروبیوتیک"، انتشارات آتا، شماره ۳۰.

میردامادی س، تنگستانی م (۱۳۹۰)، " شناسایی، جداسازی، تخلیص و بررسی طیف اثر باکتریوسینهای چند سویه

لاکتوباسیلوس بومی جدا شده از محصولات لبنی ایران"، مجله بهداشت مواد غذایی دوره ۱، شماره ۳(۳)، صفحه ۵۵-۸۷.

نجف نجفی م، نخچیان ح (۱۳۸۲)، " میکروبیولوژی شیر و فرآورده های لبنی". چاپ اول. جلد اول.

انتشارات پژوهش توس. صفحه ۵۵-۵۹.

نریمانی ط، تاری نژاد ع ر (۱۳۹۲)، " جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری های لاکتوباسیلوس با پتانسیل پروبیوتیکی از شیر گاوی و ماست سنتی شهرستان خوی"، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، ۴۸ (۱۲)، ۱۱۵- ۱۲۸.

نریمانی ط، تاری نژاد ع ر، حجازی م ا (۱۳۹۳)، " جداسازی و شناسایی باکتریهای لاکتیکی از محصولات لبنی سنتی کلیبر، هریس و ورزقان"، بهداشت مواد غذایی، دوره۳، شماره۳، (۱۱)، ۲۳-۸۵.

نواب پور ث، شهبازلو ف (۱۳۷۴)، " آیین کار آزمایشگاه های شرکت سهامی صنایع شیر ایران "، انتشارات شرکت صنایع شیر ایران. کارخانجات شیرپاستوریزه تهران.

نوحی ا (۱۳۶۷)، " میکروبیولوژی عمومی" موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران.

نیک بخت ح ر، فدائی نوغانی و، خسروی دارانی ک (۱۳۹۳)، "بررسی مقایسه ای زنده مانی پروبیوتیک های انتخابی در ماست قالبی کم چرب حاصل از شیر هموژنیزه شده تحت شرایط دمایی و مراحل مختلف"، فصلنامه علوم و فناوری های نوین غذایی، سال اول، شماره ۴، صفحه ۳-۱۱.

وثوق ا ص، خمیری م، کاشانی نژاد م، و جعفری م (۱۳۸۸)، " اثر عرق نعناع بر قابلیت بقای باکتری های پروبیوتیک در نوشیدنی سنتی ایران (دوغ)"، مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، جلد شانزدهم، شماره اول، صفحات: ۱۵۶-۱۶۴.

همایونی راد ع (۱۳۸۷)، " پروبیوتیک، پری بیوتیک و سین بیوتیک"، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تبریز.

5-2) Refrences

Abid, Y., Casillo, A., Gharsallaha,H., Joulaka, I., Lanzetta, R., Michela Corsaro,M., Attiaa,H., Azaboua, S. (2017). Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. I*nternational Journal of Biological Macromolecules*, 1-10.

Ahmadi, M., Khomeiri, M., Khosroshahi, A., and Kashani-Nejad, M. (2009). Isolation and identification of lactic acid bacteria isolated from traditional cheese Lighvan. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*. 16(3), 1-11.

Allameh, S. K., Daud, H., Mohammad Yusoff, F. (2012). Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (Channastriatus). *Afr J Biotechnol*, 11(16), 3810-3816.

Allan-Wojtas P, Truelstrup Hansen L and Paulson AT. (2008). Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. LWT - Food Science and Technology 41: 101-108.

Almena, M., Yonand, B., & Howard, A. (2005). The Nurtitioanl value of yougurt.*International Journal Immunotherapy*, 56, 25-47.

Alphy, S., Aydin, F., Kilic, A. O. (2009). Antimicrobial activity and characterization of bacteriocins produced by vaginal Lactobacilli. *Journal of microbiology*.33, 7-13.

Amatayakul, T., Halmos, A. L., Sherkat, F., and Shah, N. P. (2006). Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharideproducing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, 16(1), 40-51.

Ammor, M. S., Flóre, A. B., Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in nonenterococcal lactic acid bacteria and bifidobacterium. *Food Microbiol.* 24, 559-570.

Anonymous. (1998). Dairy design trends. World of Ingredients, Oct. 18, 20-22.

Anuj, H., Chheda., Madhavi, R., Vernekar. (2015). Enhancement of ε-poly-L-lysine (ε-PL) production by a novel producer Bacillus cereus using metabolic precursors and glucose feeding. *Biotech*, 5(5), 839–846.

Arsov, A., Tokar, K. G. (1999). The activity of pure cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptucoccus thermophilus* in enzymically hydrolysed and non-hydrolysed milk. *Dairy Science Abstracts*, 57, 575.

Asmahan Azhari, A. (2011). Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk in Khartoum State, Sudan. *Dairy Science*, 6, 66-71.

Axelsson, L . (1998). " Lactic acid Bacteria: Classification and Physiology" in Lactic acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects, edited by S. Salminen and A. Von Wright. *Marcel Dekker Inc, New York*, 1-73.

Aziz, T., Khan, H., Bakhtair, S. M., and Naurin, M. (2009). Incidence and relative abundance of lactic acid bacteria in raw milk of buffalo, cow and sheep. *Animal & Plant Sciences*. 19 (4), 168-173.

Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjema, B., Henni, D. E., Tornadijo, M. E., Kihal, M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat's milk of four Algerian races. *Food Microbiol*. 2, 579-588.

Bahadori, Z., Norouzi, J., Akhavan Sepehi, A., Sabzevari, J., and Razavipour, R. (2010). Study of β-galactosidase activity in Lactobacilli separated from milk and cheese by biochemical and PCR methods. *Quarterly Research Journal of Lorestan University of Medical Sciences*. 12 (1), 39-48.

Baruah, R., Das, D., and Goyal, A. (2016). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria: Current Trends and Applications, *J Prob Health*, 4(141), 2.

Benech, R. O., Kheadr, E. E., Lacroix, C. (2002). Fliss H. Inhibition of Listeria innocua in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology* , 68 (8), 3683-3690.

Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., and Cogan, T. M. (2001) " Recent advances in cheese microbiology" , *International Dairy Journal*, 11, 259-274.

Bomba, A., Kravjansky, I., Kastel, R., Herich, R., Juhasova, Z., Cizek, M. (1996). Inhibitory effects of *lactobacillus casei* upon the adhesion of enterotoxige *Escherichia coli* K99 to the intestinal mucosa in gnotobiotic lambs. *Small Rumi Rsearch*. 23, 199-206.

Cai, H., Rodriguez, B. T., Zhang, W., Broadbent, J. R., and Steele, J. L. (2007). Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology*. 153, 2655-2665.

Carminati, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Suárez, V., Reinheimer, J.(2010). Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. Biotechnology of lactic acid bacteria: *Novel Applications*, 177-192.

Carminati, D., Tidona, F., Fornasavi, M., Rossetti, L., Muucci, A., Giraffa, G. (2014). Biotyping of cultivable lactic acid bacteria isolated from donkey milk. Letters in Applied Microbiology, 59, 299-305.

Cesseline,B., Derre-Bobillot,A., Fernanadez,A., Lamberet, G., Lechardeur, D., Yamamoto, Y., & Gaudu,P. (2011). Responses of lactic acid bacteria to oxidative stress. *In Stress Responses Of Lactic Acid Bacteria. Springer US*, 24(6), 111-127.

Chedda, A. H., & Vernekar, M, R. (2014). Improved production of natural food preservative ε-poly-L-lysine using a novel producer Bacillus cereus. *Food Bioscience*, 7:56–63.

Cho, Y. R., Chang, J.Y., Chang, H. C. (2007). Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J Microbiol Biotechnol*, 17(1), 104-109.

Cogan, T. M. (1996). " History and Taxanomy of Starter Cultures" , in Dairy Starter Cultures, edited by T. M. Cogan and J.-P. Accolas (Wiley – VCH Inc.,*New York*, 1-25.

Collins, J. K., Thornton, G., Sullivan, G.O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. International dairy journal, 8, 487-490.

Con, A., and Cakmakci. (1996). Effects of different fruits and storage periods on microbiological qualities of fruit flavored yoghurt produced in turkey. *Journal of Food Protection*, 59, 402-406.

Coppala, R., Nanni, M., Iorizzo, M., Sorrentino, A., Sorrentino, E., Chiavari, C., and Grazia L. (2000). " Microbiolgical characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of ripening" , Lait 80, 479-490.

Crane, J., (2002). Pro and anti: The biotics of allergic disease, 57(2), II40-II47.

Crittenden, R., Karppinen, S., Ojanen, S., Tenkanen, M., Fagerstorm, R., Matto, J., Saarela, M., Mattila- Sandholm, T., & Poutanen, K. (2002). In vitro fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 82, 781-789.

Cul, H., Ozcelik, S., Sagdic, O., and Certel, M. (2005). Sourdough bread product and S. cervisiae Isolated from sourdough.process Bio chemistry, Volume 40; 691-697.

Cummings, J., Antoine, J. M., Azpiroz, R., Brandtzaeg, P., Calder, p., Gibson, G., Guarner, F., Isolauri, E., Pannemans, D., Shortt, C., Tuijtelaars, S. & Watzl, B. (2004). PASSCLAIM: Gut health and immunity. *European Journal of Nutrition*, 43, 118-174.

Davati, N. (2018). 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. *JFST No*. 74, Vol. 15.

Dave, R. I., Shah, N. P. (1997). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Int J Dairy Sci* , 7, 31-41.

De Moraes, G. M. D., de Abreu, L. R., do Egito, A. S., Salles, H. O., da Silva, L. M. F., Nero, L.A., Todorov, S.D., Dos Santos, K. M.O.(2017). Functional Properties of Lactobacillus mucosae Strains Isolated from Brazilian Goat Milk.Probiotic Antimicrob Protein, 9(3), 235-245.

De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgems, F., and Degeest, B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 687-707.

Dos Santos, K. M. O. ., de Abreu, L. R., de Moraes,G. M. D., Matos,C. R., da Silva, L. M. F., G.de M. Franco, B. D. G., Todorov, S. D. (2013). Probiotic properties of *Lactobacillus mucosae* strains isolated fromm Brazilian goat milk.IV International Symposium on Lactic Acid Bacteria: Food, Health and Applications.

Du Toit, M ., Franz, C., Dicks, L., Schillinger, U., Harberer, P., Warlies, B., et al. (1998). Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholestrol levels, faeces pH and faeces moisture content. *International Journal of Food Microbiology*, 40(1), 93 -104.

Dugas, B., Mercenier, A., Lenoir wijnkoop, I., Arnaud, C., Dugas, N., and Postaire, E. (1999). Immunity and probiotics. *Trends Immunology Today*, 20(9), 387-390.

Durme, C., Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D. and Hallorari, S. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with In vivo findings. *Clinical Nutrition*,73(2), 386- 392.

Edalatian, M. R., HabibiNajafi, M. B., Mortazavi, S. A., Nasiri, M. R., Basami, M. R. and Hashemi, S. M. (2012) .Isolation and identification of the indigenous lactic acid bacteria from Lighvan cheese. *Journal of Food Industry and Science*. 9(37), 9- 22. [inFarci]

Ehsani, A., Mahmudi, R., Tokmechi, A., and Pajohi, M. R. (2011). Iranian white cheese as a food carrier for probiotic bacteria, *Journal of Food Industry and Science*, 8(31), 77-83.

Elgadi, Z. A. M., Abdel Gadir, W. S., and Dirar, H. A. (2008). Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeast from raw milk in Khartoum State (Suda). *Microbiology*. 3(3), 163-168.

El-Sersy, N. A., Abou-Elela, G. M., Abd-Elnaby, H., Ebrahim, H. A. H., El-Toukhy, N. M. K. (2010). Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber. Afr. J. Biotechnol.* 9(38), 6355-6364.

Erkus, O. (2007). Isolation phenotypic and genotypic characterization of yoghurt starter bacteria. The characterization of yoghurt starter bacteria.The Graduated School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology. *Master Thesis*.

Esmaeili, A., Ghaedi, K. (2010). GABAA receptors as novel drug targets for treatment of mental disorders. *J Paramed Sci*, 1(3), 50-61.

Esmaeili, A., Lynch, J. W., Sah, P. (2009). GABA receptors containing gammal subunits contribute to inhibitory transmission in the central amygdala. J Neurophysiol, 101(1), 341-349.

Fortina, M. G., Ricci, G., Borgo, F., and Manachini, P. L. (2006). Rapid identification of targeted to 16S rRNA gene. *Letters in Applied Microbiology*. 56, 6266-8254.

Gardner,, N. J., Savard, T., Obermeier, P., Caldwell, G., Champagne, C. P. (2001). Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *Int J Food Microbiol*, 64(3), 261-275.

Garvie, E. I. (1984) Taxonomy and Identification of Bacteria Important in Cheese and Fermented Dairy Products" , in Advances in The Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk, edited by F. L. Davies and B. A. Law *Elsevier Applied sciencePublishersLTD.England*, 35-67.

Gasson, M. J., De Vos, w. (1994). Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. *London: Blakie Academic and professional*, 14-15.

Ghotbi, M., Soleymaniyan Zad, S. and Sheikh Zeinoddin, M. (2010). Identification of facultative hetrofermentive in Lighvan cheese. *Iranian Food Science Technology*. 6(2), 145-148. (in Farci)

Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, 1401–1412.

Guarner, F. (2008). Probiotic and prebiotic world Gastroenterology Organisation Practice Guideline, 1-22.

Guo, F., Zheng, H., Cheng, Y., Song, S., Zheng, Z., and Jia, S. (2018). Medium optimization for ε-poly-L-lysine production by Streptomyces diastatochromogenes using response surface methodology. *Lett Appl Microbiol*, 66(2), 124-131.

Hammes, W. P., Hertel, C. H. (2009). Genus Lactobacillus. In: Whitman, W. B., Vos, p. D., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., et al. editors. Bergey′ s manual of systematic Bacteriology. *2nd ed. New York: University of Georgia*, 465- 511.

Hammes, W. P., Vogel, R. F. (1995). The genus Lactobacillus. In: Wood, B.J.B.; Holzapfel, W.H (eds), the genera of lactic acid bacteria, vol. 2. The genera of lactic acid bacteria. *Blackie Academic and Professional. London, United Kingdom*. 19-54.

Hasani, M., Farajnia, S., Hesari, J., and Musavi, M. H. (2008). Isolation of two species of lactobacillus from traditional Lighvan cheese and determination of their important functionality properties. 18th national congress of food technology Mashhad. I. R. Iran.

Hasani, M., Hesari, J., Farajnia, S and Moghadamvahed, M. (2011). Technological properties of lactobacillus species predominate in traditional cheese Lighvan. *Journal of Food Industrial Researchs*. 21 (4), 535- 545. [inFarci].

Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsomoto, K., Sansawa, H., Yamori, Y. (2004). Effect of γ- aminobutyric acid enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. Br J Nutr, 92(3), 411-417.

Hayakawa, K., Nakazawa,Y. (1992). Classification and actions of food microorganisms with particular reference to fermented foods and lactic acid bacteria.Elsevier Applied Sciences, London, 127-164.

Hejazi, M. A., Khosroshahli. M., Barzegari, A., Lotfi, H. and Mokhtari Zunuzi, P., Alizadeh, S. (2012). Molecular identification of probiotic bacteria in traditional dairy products of Azarbaijan using 16S rRNA. *Journal of Agricultural Engineering Research*. 13 (3), 51- 62. [inFarsi]

Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14(6), 467-494.

Higuchi, T., Hayashi, H., Abe, K. (1997). Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a Lactobacillus strain. *J Bacteriol*, 179(10), 3362-3364.

Hiraga, K., Ueno, Y., Oda, K. (2008). Glutamate decarboxylase from lactobacillus brevis: activation by ammonium sulfate. Biosci Biotechnol Biochem, 72(5), 1299-1306.

Holt, P. G. (2000). Parasites, atopy and hygiene hypothesis, 356(9243), 1699-1701.

Hozapfel, W. H., and Wood, B. J. B. (1995). The general of lactic acid bacteria. *Blackie Academic and Professional*, *Glasgow*.

Institute of Standards and Industrial Research of Iran.no 11324. (2009). Probiotic doogh-Specifications and test methods. ISIRI. [in Persian]

ISIRI. Standard No. 695. (2012). Yogurt - Features and Methods of Examination (Revision). Tehran: Institute of Standards and Industrial Research of Iran.[in Persian]

Jozala, A., Novaes, L., Cholewa, O., Moraes, D. (2005). Vessonipenna T. C. Increase of nisin production by Lactococcus lactis in different media. *African Journal of Biotechnology*. 4, 262- 265.

Kahar, P., Iwata, T., Hiraki, J., Park, E. Y., Okabe, M. (2001). Enhancement of ε-polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control. *J Biosci Bioeng*, 91, 190–194.

Kamal, E. M., El Kahlout, Ismail M., El Quqa, Mahmoud W., El Hindi, Tarek A., El Bashiti. (2018). Isolation, Biochemical Characterization and DNA Identification of Yogurt Starters *Streptococcus thermophilus* & *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* in Gaza Strip. *Advances in Microbiology*, 8, 1005-1020

Kandler, O., Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901 , 212AL. B*ergey's manual of systematic bacteriology*, 2, 1209-1234.

Katiresan, k., & Thiruneelakandan, G. (2003). Prospects of lactic acid bacteria of marine origin. *Indian Journal of Biothechnology.*

Kelley, J. M., Hughes,L. B., Bridges, S. L. (2008). Does gamma-aminobutyric acid (GABA) influence the development of chronic inflammation in rheumatoid arthritis. *J Neuroinflammation*, 5:1.

Kheiri Yegane Azar, B., Esmaili, A., Rabbani, M. (2012). Cloning of glutamate decarboxylase and production of γ- aminobutyric acid from *lactobacillus brevis.Res Pharm Sci, 7(5), S421.*

Kim, J. Y., Lee, M. Y., Li, G. E., Lee, Y. S., Hwang, K. T. (2009). Production of gamma-aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *lactobacillus brevis* GABA100. *Int J Food Microbiol*. 130(1), 12-16.

Kim, S. H., Shin, B. H., Kim, Y. H, Nam, S. W, Jeon, S. J. (2007). Cloning and expression of a full-length glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus brevis* BH2. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 12(6), 707-12.

Kim, S., Yong Cho, S., Song, O., Shin, I.S., Su Cha, D. and Park, H. (2006). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in Lactobacillus acidophilus ATCC 43121. *Food Science and Technology*, 41(3), 493- 500.

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

Klaenhammer, T., Altermann,E ., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Hols, P., Hutkins, R., Chaillon, S., Deutscher, J., Gasson, M., Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Kleerebezemm, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., Macky, L., Mills, D., Nauta, A., Orerbeek, R., Pel, H., Pridmor, D., Saier, M., Sinderen, D., Sorokin, A., Steel, J., Osullivan, D., Vos, W, Weimer, B., Zagore, C. M ., and Siezen, R. (2002). Discovering Lactic acids bacteria by genomics. *Antonie Leeuwnhoek*, 82, 22-58.

Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamotoa, S., Momosed, H., Kimurab,T. (2005). Production of γ-aminobutyric acid (GABA) by Lactobacillus paracasei isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol*, 22(6), 497-504.

Kopp., Hoolihan, L. (2001). Prophylactic and therapeutic use of probiotics, 101(2), 222-238.

Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., & Von Wright, A. (2011). Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. CRC Press.

Laurent, M. A., Boulenguer, P. (2003). Stabilization of acid dairy drink (ADD) induced by pectin. *Food Hydrocolloid*. 17, 445−454.

Lee, N. K., Paik, H. D. (2017). Bioconversion using lactic acid bacteria: Ginsenosides, GABA, and phenolic compounds. J Microbiol Biotechnol, 27(5), 869-877.

Li, H., Cao, Y. (2010). Lactic acid bacteria cell factories for gamma-aminobutyric acid. Amino Acids, 39(5), 1107-1116.

Li, H., Cao, Y., Gao, D., Xu, H. (2008). A high γ-aminobutyric acidproducing ability *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese traditional paocai. *Ann Microbiol*, 58(4), 649-53.

Lilly, D. M., Stillwell, R. H. (1965). Probiotics; Growth promoting factors produced by microorganisms. Science, 147(3659), 747-748.

Lin, Q., Yan, S., Lu, F., Lu, Z., Bie, X., Jiao,Y., Zou, X. (2009). Cloning and expression of glutamate decarboxylase gene from *streptococcus thermophilus* y2. *J Gen Appl Microbiol*, 55(4), 305-310.

Lopez-Diaz, T. M., Alonso, C., Roman, C., Garcia-Lopez, M. L., and Moreno, B. (2000). Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese" , Food Microbiology, 17, 23-32.

Lu, X., Xie, C., Gu, Z. (2009). Optimisation of fermentative parameters for GABA enrichment by *Lactococcus lactis*. *Czech J Food Sci*, 27(6), 433-442.

Marothi, Y. A., Agnihotri, H. (2005). Enterococcal resistance-An overview. Indian J Med Microbiol. 23, 214-219.

Marshall, M. E. and Law, B. (1984)." The Physiology and Growth of Dairy Lactic-acid bacteria" in Advances in The Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk, edited by F. L. Davies and B.A.Law, *ElsevierApplied science Publishers LTD. England*, 35-67.

Mäyra-Mäkinen, A. and Bigret, M. (1998). Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria" , in Lactic acid Bacteria, Microbiology and Functional aspects, edited by S.Salminen and A. Von Wright , *Marcel Dekker Inc, New York*, 73-103.

Mazur, R., Kovalovska, K., Mazur, J. R., Hudec, J. (2011). Changes in selectivity of gamma-aminobutyric acid formation effected by fermentation conditions and microorganisms resources. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*, 1(2), 164-171.

Mirdamadi, S., Rajabi, A., Aziz Mohseni, F., and Momen, B. (2007). Lactic acidproduction by Lactobacillus strains. *Iranian Journal of Nutrition Sciences &Food Technology*. 2(3), 57-64.

Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucle, G., Willemote, R. M., and Remaudsimeon, M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 11(9), 675-685.

Morelli, L. (2000). In vitro selection of probiotic lactobacilli: Acritical appraisal. *Curr Issues Intest Microbiol*, 1(2), 59-67.

Murch, S. H. (2001). Toll of allergy reduced by Probiotics, 357(9262), 1057-1059.

Natalia, Ch. A., Patricia, B. Z., Luciana, F. F., Juliana, C. A., Izildinha, M., Ariene, G.F. and Darlila, A. G. (2013). Characterizationof fresh cheese with addition of probiotics and prebiotics. *Journal of Life Sciences*. 7(2), 189-195.

Nermeen, A., El-Sersy., Abeer, E., Abdelwahab., Samia, S., Abouelkhiir., Dunja-Manal., Abou-Zeid and Soraya,A., Sabry. (2012). Antibacterial & Anticancer activity of ε- poly- L- Lysin (ε-pl) produced by a marine *Bcillus Subtilis* Sp. *Journal of Basic Microbiology*, 52, 1-10.

Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Furukawa, S., Suzuki, I. (1998). Production of gamma-aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *J Dairy Sci*, 81(6), 1486-1491

Nomura, M., Nakajima, I., Fujita, Y., et al. (1999). *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene. *Microbiology*, 145(6), 1375-1380.

Oh, S. H., Oh, C. H. (2003). Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. *Food Sci Biotechnol*, 12(3), 248-252.

Oh, S. H., Soh, J. R., Cha. Y. S. (2003). Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohole- related symptoms. *J Med Food*, 6(2), 115-121.

Orlajensen, S. (1993). The Lactic Acid Bacteria. Ejnar Munskgarad. Complentary Volume. *Copenhagen, Denmark.*

Oyetayo, V., Adetuyi, F., Akinyosoye F. (2004). Safety and protective effect of *lactobacillus acidophilus* and *lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo. *African Journal Of Biotechology*, 2(11), 448-452.

Park, K. B., Oh, S. H. (2006). Isolation and characterization of *Lactobacillus buchneri* strains with high gamma-aminobutyric acid producing capacity from naturally aged cheese. *Food Sci Biotechnol*,15(1), 86-90.

Parvez, S., Malik, K., Ah Kang, S., Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol*, 100(6), 1171-1185.

Pereira, D. I., Gibson, G. R. (2002). Effect of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 259-281.

Piri, M., & Oryan, S. (2004). Hypolipidemic effect of leaf and seed of Anethum graveolens on normal and stereptozocin – induced diabetic rats. Teacher Training University. 45, 9-15.

Quigley, L., O′Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F, et al. (2013). The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiology Reviews, 37(5), 667-698.

Reid, G. (1999). The scientific basis for probiotic strains of lactobacillus applied and environmental microbiology, 65(9), 3763-3766.

Robinson, R. K. (1991). Therapeutic Properties of Fermented Milks. London: *Elsevier*.

Roissart, H. D, Luquet, F. (1994) .Bacteries Lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques. Uriage: Lorica.

Rossetti, V., Lombard, A. (1996). Determination of glutamate decarboxylase by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 681(1), 63-67.

Rybka, S., Kailasapathy, K. (1997). Effect of freeze drying and storage on the microbiological and physical properties of AB−yoghurt. *Milchwissenschaft* 52(7), 390−394.

Sahadeva, R. P. K., Leong, S. F., Chua, K.H., Tan, C. H., Chan, H. Y., Tong, E. V., et al. (2011). Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *Int Food Res J*, 18(4), 1515-1522.

Saxelin, M., Grenov, B., Svensson, U., Fonden, R., Reniero, R., Mattila-Sandholm, T. (1999). The technology of probiotics. *Trends Food Sci Tech*,10, 387−392.

Saxelin, m., Korpela, P., and Mayra Makinen, A.(2003). Introduction: classifying functional dairy products, *Functional dairy products Boca Raton, LA, USA*: CRC, 1-16.

Scherezenmeir, J., De verse, M. (2001). Probiotics and synbiotics- approaching a definition. *Am J Clin Nutr*, 73(2), 361-364.

Schleifer, K. H. and Ludwig, W. (1995). " Phylogenetic relationship of lactic acid bacteria" in The Lactic acid Bacteria, The Genera of Lactic acid Bacteria, Volume 2, edited by B. J.B. Wood and W. H. Holzapfel, *Blackie Academic & Professionals, Glasgow*, 55-125.

Sengun, I. Y., Nielsen, D., Karapinar, M. and Jakobsen, M. (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. *International Journal of Food Microbiol*, 135, 105- 111.

Sharpe, M. E. (1979). Identification of lactic acid bacteria. In Skinner,F.A.: Lovelock, D.W. (eds). Identification Methods for Microiologists, *Academic Press, London*, 233-259.

Shibata, K., Flores, D. M., Kobayashi, G., and Sonomoto, K. (2007). Direct L-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic Lactic acid bacterium *Enterococcus faecium*. *Enzyme and Microbial Technology*. 41, 149-155.

Shih, I. L., Van, Y.T., Shen, M.H. (2004). Biomedical applications of chemically and microbiologically synthesized poly(glutamic acid) and poly(lysine) *Mini Rev Med Chem*, 4, 179–188.

Shih, I.L., Shen, M. H., Van, Y. T. (2006). Microbial synthesis of poly (ε-lysine) and its various applications. *Bioresour Technol*, 97,1148–1159.

Shima, S., Matsuoka, H., Iwamoto, T., Sakai, H. (1984). Antimicrobial action of ε-poly-l-lysine. *J Antibiot*, 37,1449–1455.

Shima, S., Sakai, H.(1977). Polylysine produced by *Streptomyces*. *Agric Biol Chem*, 41, 1807–1809.

Shlyakhovenko, K. A., Olishevsky, S. V., Kozak, V. V., Yanish, Y. V., Rybalko, S. L. (2003). Anticancer and immunostimulatory effects of nucleoprotein fraction of *Bacillus Subtillis*, 7025 culture mediumfiltrate. Exp. Oncol, 25, 119-123.

Shortt, C., and Obrien, J. (2003). Handbook of Functional dairy products. *Chemical Rubber Company press. London*, 15-19.

Sieladie, D. V., Zambou, N. F., Kaktcham, P. M., Cresci, A., Fonteh, F. (2011). Probiotic properties of lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon. *Innov Romanian Food Biotechnol* , 9(12), 12-28.

Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., Gobbetti, M.(2007). Synthesis of γ- aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Itallian cheeses. *Appl Environ Microbiol*, 73(22), 7283-7290.

Small, P. L., Waterman, S. R. (1998). Acid stress, anaerobiosis and gadCB: lessons from Lactococcus lactis and Escherichia coli. *Trends Microbiol*, 6(6), 214-216.

Stanton, C., Desmond, C., Fitzgerald, G. F.,Collins, K. & Ross, R. P.(2005). Environmental adaptation of probiotic lactobacilli toward improvement of performance during spray. *International Dairy Journal*, 12, 183-190.

Strachan, D. P. (2000). Infection and atopy: The first decade on the hygiene hypothesis, 55(suplement 2000 year in review), S2

Stroble, R., Jorissen, L., Schliermann,T., Trapp, V., Schutz, W., Bohmhammel, K., Wolf, G., & Garche, J. (1999). Hydrogen adsorption on carbon materials. *Journal of Power Sources*, 84(2), 221-224.

Sun, T. S., Zhao, S. P., Wang, H. K., Cai, C. K., Chen, Y. F., Zhang, H. P. (2009). ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by *Lactobacillus helveticus* isolated from Xinjiang koumiss in China. *Eur Food Res Technol*, 228(4), 607-612.

Sundaram, S., Priyanka, D., Shalini, P. (2011). In vitro evaluation of antibacterial activities of crude extracts of *withania somnifera* to bacterial pathogens. *Asian J. Biotechnol*, 3(2), 194-199.

Tafvizi, F., Tajabadi Ebrahimi, M. and Khajare, L. (2013). Molecular identification of probiotic lactobacilli in traditional food and drink Tarkhineh using 16S rRNA sequence. *Food Technology and Nutrition.* 10 (2), 61-68. [inFarci]

Taherzadeh, M., Esmaieli, A., Rabanni, M. (2013). Identification of Glutamate decarboxylase gene in Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus. *1st Tabriz*

International Life Science Conference & 12th Iran Biophysical Chemistry Conference. Tabriz, Iran.

Tamime, A. Y. (2005). Probiotic dairy products. *New York: Blank Well*.

Taneera, J., Jin, Z., Jin, Y., et al. (2012). γ-Aminobutyric acid (GABA) signalling in human pancreatic islets is altered in type 2 diabetes. *Diabetologia* ,55(7), 1985-1994.

Tufail, M., Hussain, S., Malik, F., Mirza, T., Parveen, G., Shafaat, S., et al. (2011). Isolation and evaluation of antibacterial activity of bacteriocin product by *Lactobacillus bulgaricus* from yogurt. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (22), 3842-3847.

Urkat, Z., Dagbagli,S., & Goksungur, Y. (2007). Optimization of pullulan production using ca alginate immobilized Aureobasidium pullulans by respons surface methodology. *Journal of Chemical technology and biotechnology*, 82(9), 837-846.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev*. 60, 407-438.

Water, J., Keen, C. L., Gershwin, M. E. (1999). The influence of chronic Yogurt Consumption on immunity, 129(75), 1492-1496.

Wouters, J. T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J., Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12, 91-109.

Wu, T. Y., Tsai, C. C., Hwang, Y. T., Chiu, T. H. (2012). Effect of antioxidant activity and functional properties of Chingshey purple sweet potato fermented milk by *lactobacillus acidophilus*, l. delbrueckii subsp. lactis, and L. gasseri strains. *J Food Sci* , 77(1), 2-8.

Yan, P. M., Xue, W. T., Tan, S. S., Zhang, H., Chang, X. H. (2008). Effect of inoculating lactic acid bacteria starter cultures on the nitrite concentration of fermenting Chinese paocai. *Food Control*, 19(1), 50-55.

Yang, S. Y., Lu, Z. X., Lu, F. X., Bie, X. M., Sun, L. J., Zeng, X. X. (2006). A simple method for rapid screening of bacteria with glutamate decarboxylase activities. *J Rapid Methods Autom Microbiol*, 14(3), 291-298.

Yokoyama, S., Hiramatsu, J., Hayakawa, K. (2002). Production of gamma-aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO-1. *J Biosci Bioeng*, 93(1), 95-97.

Zacarchenco, P. B., & Massaguer – Roig, S. (2006). Properties of *Streptococcus thermophilus* fermented milk containing variable concentration of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus*.*Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 338-344.

Zhang, X. Y., Zhao, L., Jiang, L., Dong, M. L., Ren, F. Z. (2008). The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage. *Food Control*, 19(12), 1191-1195.

Zhang, Y., Feng, X. H., Xu, H., Yao, Z., Ouyang, P.K. (2010). ε-Poly-l-Lysine production by immobilized cells of *Kitasatospora* sp. MY 5–36 in repeated fed-batch cultures. *Bioresour Technol*, 101, 5523–5527.

Zhu, Y. Y., and Zhang, Y. (2000). Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83, 597–610.

Zobkova, Z. S. (1979). Effect of story period of 1.5% fat fruit yoghurt on its characteristics. Trudy, Vsesoyuznyi Nauchno Issledovatel Skii-Institut Molochnoi Promyshlennosti, 47, 36-37.

Abstract

In the present study,the traditional dairy products included cheese, yoghurt, dough and dried whey in various rural eras of shahrood province like Calpoush, Kalate khij and Mojen were isolated to considere to hygiene standard condition. The Single colony of suspicious acid lactic bacteria which were grown in central MRS agar were selected for further identification. Diagnosis tests and macro and micro form of bacteria were

applied to initially recognize the species, subsequently 16S rRNA was used to precisely confirm species obtaining from previous examination. The results revealed that the isolated bacteria from Kalate khij dough were highly similar to *Lactobacillus Delbruckii SB7,Lactobacillus Delbruckii-bulgaricus TW49-1*, the bacteria isolated from Kalpoush dough was so similar to *Lactobacillus Paracasei Lb37* and *Lactococcus lactis-NCIM 2114*. The similar species of *Lactobacillus Mocosae-BJ18-2* and *Lactobacillus Delbruckii SkB1083* were also detected in kalate khij yoghurt. ε poly l lysine produced was also analyzed in all isolated bacteria. Initial experimentation indicated that *Lactobacillus Delbruckii-bulgaricus* obtained from kalate khij dough was determined as a good source of ε-poly l lysine. Carbon (glucose) and protein (soy bean powder) sources as variable factors were optimized using response surface method for higher ε- poly-l- lysine production. In optimal condition 205 ppm of this vital component was attained after 3 days of fermentation time which was so close to predicted value obtained by RSM (199.22). The model indicated that a reduction in two variable factors had a positive effect on ε- poly-l-lysine. The highest quantities of ε- poly-l- lysine was obtained in the medium containing 26.03 gr/l glucose & 6.28 gr/l soy bean powder.

Key words: Lactic acid bacteria, ε-poly l lysine metabolit, NCBI, RSM model.

Shahrood University of technology

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Food Sciences

Isolation and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria From Shahrood City Traditional Dairy Products

By: Zohreh Beigom Tabatabaie

Supervisor:

Dr. Hamidreza Samadlui

Advisor:

Dr. Shahrokh Gharanjic

June 2019