

## جداسازی باکتری های اسید لاکتیک از کشک و غربالگری آنها براساس ویژگی های

### پروبیوتیکی

بهاره صبوری<sup>۱</sup>، فخری شهیدی<sup>۲</sup>، سارا هدایتی<sup>۳\*</sup>، علی جوادمنش<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳. استادیار مرکز تحقیقات تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۴. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

آدرس پست الکترونیک نویسنده مسئول

Email: sara\_hedayatii@yahoo.com

### چکیده

در این پژوهش پتانسیل پروبیوتیکی باکتری های اسید لاکتیک جداسازی شده از دو نمونه کشک استان های فارس (شهرستان آباده) و خراسان رضوی (منطقه کلات) مورد بررسی قرار گرفته است. برای جداسازی باکتری های اسید لاکتیک از کشک محلی از محیط کشت MRS و ۱۷M استفاده شد. سپس شناسایی باکتری های جدا شده براساس ویژگی های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انجام شد و برای شناسایی مولکولی جدایه های باکتری های اسید لاکتیک از PCR استفاده شد. برای بررسی خاصیت پروبیوتیکی جدایه ها، زنده مانی سلول در شرایط شبیه سازی شده معده و روده، مقاومت به نمک های صفراوی، مقاومت به آنتی بیوتیک، خاصیت ضد میکروبی، آبگریزی و چسبندگی سلول مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد جدایه ها انتروکوکوس فاسیوم KKP 3772، انتروکوکوس فاسیوم C1، پدیوکوکوس پنتوزاسئوس H1.1 (KF3)، لاکتوکوکوس لاکتیس Rsg، انتروکوکوس فکالیس P190052، انتروکوکوس ماندتی CECT972T، پدیوکوکوس پنتوزاسئوس VNK-1 و لاکتوباسیلوس پلانتاروم PM411 بودند. انتروکوکوس ماندتی CECT972T و انتروکوکوس فاسیوم EU428011 حساسترین و پدیوکوکوس پنتوزاسئوس VNK-1 و پدیوکوکوس پنتوزاسئوس H1.1 مقاومترین جدایه ها به نمک های صفراوی بودند جدایه ها نسبت به تتراسایکلین مقاوم و نسبت به کلرامفنیکل و جنتامایسین حساس بودند. بیشترین و کمترین آبگریزی سطحی و خودتجمعی مربوط به پدیوکوکوس پنتوزاسئوس VNK-1 (KK4) و انتروکوکوس ماندتی CECT972T بود.

واژگان کلیدی: کشک، باکتری اسید لاکتیک، پروبیوتیک

## مقدمه

باکتری های اسید لاکتیک در بهبود ویژگی های حسی مواد غذایی و افزایش کیفیت آن ها نقش دارند، همچنین اثرات مفید آن ها بر سلامت مصرف کننده مورد توجه محققان قرار گرفته است (Tulini, 2014). از خواص این باکتری ها می توان به تولید متابولیت هایی مانند هیدروژن پراکسید، باکتریوسین، اسید لاکتیک، دی استیل، استالدئید و روترین که مانع رشد پاتوژن های ناشی از مواد غذایی و میکروارگانیسم های عامل فساد می شوند، اشاره کرد. از دیگر ویژگی های مهم باکتری های اسید لاکتیک، توانایی اصلاح پروتئین های شیر طی فرایند تخمیر است که نقش مهمی در اصلاح پتانسیل حساسیت زایی پروتئین های شیر ایفا نموده و سبب تولید پپتیدهای زیست فعال می شوند که فعالیت های مختلف بیولوژیکی مثل خاصیت آنتی اکسیدانی، ضد فشار خون و ضد میکروبی دارند. برخی از باکتری های اسید لاکتیک دارای خاصیت پروبیوتیکی هستند. واژه پروبیوتیک که متضاد واژه آنتی بیوتیک است، از زبان یونانی گرفته شده و به معنی "برای زندگی" است. استیل لیلی و ول در سال ۱۹۶۰ اولین بار واژه پروبیوتیک را به منظور توضیح مواد ترشحه توسط یک میکروارگانیسم که رشد میکروارگانیسم دیگر را تحریک می کند، استفاده کردند (وجدانی و زالی، ۱۳۸۲). پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که اثرات مثبتی بر سلامتی میزبان دارند. این باکتری ها جهت اعمال اثرات مفید خود، باید در شرایط اسیدی معده و شرایط قلبیایی روده کوچک زنده بمانند، غیر بیماریزا و غیرسمی باشند و ایمنی را برای مصرف کننده تامین کنند (Barakat et al., 2011). پروبیوتیک ها همچنین در ایجاد ویژگی های خاص مثل طعم، بو و بافت فرآورده های لبنی سنتی نقش مهمی ایفا می کنند. (Chowdhury, & Islam, 2016) یکی از بهترین روش های رساندن پروبیوتیک ها به دستگاه گوارش استفاده از مواد غذایی ناقل این باکتری ها است. کشک حاوی باکتری های اسید لاکتیک است که پتانسیل پروبیوتیکی دارند. لذا در این پژوهش به جداسازی باکتری های اسید لاکتیک از نمونه های کشک شهرستان آباده در استان فارس و منطقه کلات در استان خراسان رضوی پرداخته شده است و سپس ویژگی های پروبیوتیکی آن ها مورد بررسی قرار گرفته است و بهترین سویه ها از نظر ویژگی های پروبیوتیکی معرفی شده اند

## روش پژوهش

نمونه برداری:

نمونه های کشک که به صورت محلی تولید شده بودند، از ۹ محل استان فارس (شهرستان آباده) و استان خراسان (کلات) جمع آوری شد و نمونه ها تحت شرایط دمایی یخچال (۴ درجه سانتی گراد)، برای جلوگیری از ایجاد آلودگی ثانویه، به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

جداسازی باکتری ها:

کشت نمونه ها و آزمایش های میکروبی و بیوشیمیایی، در کوتاه ترین زمان ممکن پس از انتقال به آزمایشگاه صورت پذیرفت. برای جداسازی باکتری های اسید لاکتیک از کشک از محیط کشت MRS و M17 استفاده شد.

شناسایی باکتری های جدا شده:

کلنی ها براساس خصوصیات مورفولوژیکی (شکل، رنگ و اندازه)، ویژگی های فیزیولوژیکی (رشد در دمای ۱۰، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی گراد، رشد در غلظت های ۲، ۴ و ۶/۵ نمک کلرید سدیم) و خصوصیات بیوشیمیایی (تولید کاتالاز، فعالیت اکسیداز و هیدرولیز آرژنین) شناسایی شدند. سپس برای شناسایی مولکولی از آزمون PCR استفاده شد.

ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی

برای بررسی پتانسیل پروبیوتیکی آزمون های مختلفی انجام شد که عبارتند از: آزمون زنده مانگی سلول در شرایط مشابه معده و روده، آزمون مقاومت آنتی بیوتیکی، خاصیت ضد میکروبی، خاصیت آبرگریزی سطح سلولی و خاصیت خود تجمعی

آنالیز آماری:

برای مقایسه میانگین ها از روش آزمون چند دامنه ای دانکن و در سطح اطمینان ۹۵ درصد از نرم افزار SPSS استفاده شد.

### یافته ها

در این پژوهش با بررسی ویژگی های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی ۱۵ جدایه تا حد جنس شناسایی شدند و به عنوان جنس های لاکتوباسیلوس، پدیوکوکوس، لاکتوکوکوس و انتروکوکوس تعیین شدند. با توجه به گروه بندی که توسط آزمایش های مبتنی بر کشت به دست آمد، در مجموع ۸ جدایه از گروه های مختلف انتخاب و مورد آزمون قرار گرفت. ابتدا DNA جدایه های مورد نظر استخراج شد. در مرحله ی بعد با کمک تکثیر ژن 16 S rRNA انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده از آنالیز ژن S rRNA 16 مشخص شد که جدایه ها با درصد مشابهت بیش از ۹۷ درصد متعلق به انتروکوکوس فاسیوم (KF1) KKP 3772، انتروکوکوس فاسیوم (KF2) C1، پدیوکوکوس پنتوزاسئوس (KF3) H1.1، لاکتوکوکوس لاکتیس (KK1) Rsg، انتروکوکوس فکالیس (P190052) (KK2)، انتروکوکوس ماندتی (KK3) CECT972T، پدیوکوکوس پنتوزاسئوس (KK4) VNK-1 و لاکتوباسیلوس پلانتاروم (PM411) (KK5) بودند. در میان این جدایه ها، سه جدایه اول مربوط به نمونه های کشتک آباده (فارس) بود و بقیه جدایه ها از نمونه های کشتک کلات (خراسان رضوی) جداسازی شد. پس از جداسازی و شناسایی جدایه ها بررسی ویژگی های پروبیوتیکی جدایه ها مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا مقاومت جدایه ها نسبت به pH پایین (۲ و ۳)، GIT و نمک های صفراوی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده، پس از ۳ ساعت گرمخانه گذاری در pH 2، ۳ تا ۶ واحد لگاریتمی بسته به نوع جدایه در تعداد باکتری کاهش مشاهده شد. در حالی که این کاهش در pH 3 مشاهده نشد، به جز جدایه لاکتوکوکوس لاکتیس که پس از ۳ ساعت انکوباسیون حدود ۱/۵ واحد لگاریتمی در تعداد باکتری ها کاهش مشاهده شد. همه جدایه ها به جز لاکتوکوکوس لاکتیس را می توان از نظر این ویژگی به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفت. به طور کلی در بین تمامی جدایه ها انتروکوکوس ماندتی (CECT972T) (KK3) و انتروکوکوس فاسیوم (KF2) EU428011 حساس ترین جدایه ها به نمک های صفراوی هستند. اما، پدیوکوکوس پنتوزاسئوس (KK4) VNK-1 و پدیوکوکوس پنتوزاسئوس (KF3) H1.1 بیشترین مقاومت را نشان داده اند که نشان از توان متابولیکی بالای این جدایه ها در فعال سازی چرخه های ایجاد مقاومت به صفرا دارد. بیشترین آبگریزی مربوط به پدیوکوکوس پنتوزاسئوس (7/66) (KK4) VNK-1 (درصد) و کمترین مربوط انتروکوکوس ماندتی (4/22) (KK3) CECT972T (درصد) است. بیشترین خود تجمعی مربوط به پدیوکوکوس پنتوزاسئوس (2/60) (KK4) VNK-1 (درصد) و کمترین مربوط انتروکوکوس ماندتی (6/33) (KK3) CECT972T (درصد) است. میزان خودتجمعی پدیوکوکوس پنتوزاسئوس (2/60) (KK4) VNK-1 (درصد) نسبت به سویه شاهد لاکتوباسیلوس رامنسوس (3/54) GG (درصد) بیشتر می باشد که نشان می دهد آن ها ممکن است خواص چسبندگی سلولی بهتری نسبت به لاکتوباسیلوس رامنسوس GG داشته باشند. میزان خودتجمعی از لحظه شروع فرایند تا ۲۴ ساعت رو به افزایش بوده است. باکتری های با توانایی تجمع و آبگریزی سطح سلول بیشتر، توانایی بیشتری برای چسبیدن به اپیتلیوم روده دارند.

فعالیت ضد میکروبی جدایه های پدیوکوکوس پنتوزاسئوس (KK4) VNK-1 و پدیوکوکوس پنتوزاسئوس (KF3) H1.1 بیشتر از تمام سویه ها می باشد و هاله مهار آن ها بزرگ تر است. جدایه های انتروکوکوس ماندتی (KK3) CECT972T و لاکتوباسیلوس پلانتاروم (KK5) PM411 در تیمارهای مختلف کمترین هاله مهار را نشان دادند. به طور کلی نتایج بدست آمده نشان می دهد که در شرایطی که هیچ تیماری بر روی نمونه ها انجام نشده تمامی جدایه ها دارای اثرات ضد میکروبی کم تا زیاد (مهار کم، +، ۱۱-۱۵ میلی متر)؛ متوسط، ++ (۲۰-۱۵ میلی متر) و زیاد +++ (۲۱ میلی متر) هستند. در مقایسه بین نمونه های تیمار نشده و نمونه های تیمار شده با آنزیم کاتالاز میزان مهار تمامی جدایه های تغییری نکرده و تنها در مورد جدایه لاکتوباسیلوس پلانتاروم (KK5) PM411 هاله مهار آن کوچک شده و فعالیت ضد میکروبی آن کاهش یافته است. تیمار حرارت تنها بر جدایه های انتروکوکوس ماندتی (KK3) CECT972T و لاکتوکوکوس لاکتیس (KK1) Rsg تاثیرگذار بوده و باعث کاهش فعالیت ضد میکروبی آن ها شده

است. در مقایسه بین نمونه‌های تیمار نشده و نمونه‌های تیمار شده در محیطی با pH خنثی، میزان مهار جدایه‌ها در محیط خنثی از بین رفته و دارای فعالیت ضد میکروبی نیستند و تنها جدایه KK4 در برابر تمامی سویه‌های پاتوژن دارای میزان مهار اندکی است. به طور کلی به ترتیب بیشترین و کمترین فعالیت ضد میکروبی توسط تمامی جدایه‌ها در محدوده مهار کم تا زیاد در مقابله استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 و سودوموناس آئروجینوزا PTCC 1707 مشاهده شده است.

## نتیجه‌گیری

به طور کلی در بین تمامی جدایه‌ها، پدیوکوکوس پنتوزاسئوس (VNK-1 (KK4 و پدیوکوکوس پنتوزاسئوس (H1.1 (KF3 نسبت به سایر جدایه‌ها ویژگی‌های پروبیوتیکی بهتری نشان داده‌اند. اما، جدایه‌های انتروکوکوس ماندتی (CECT972T (KK3 و انتروکوکوس فاسیوم (EU428011 (KF2 نسبت به سایر جدایه‌ها از نظر پروبیوتیکی ضعیف‌تر عمل می‌کنند. غذاهای سنتی تخمیری، مخصوصاً نمونه‌هایی که با فراورده‌های لبنی تولید می‌شوند، به واسطه فراسودمند بودن بسیار مورد اهمیت هستند. به واسطه‌ی افزایش شهرنشینی و صنعتی شدن و عدم استقبال از غذاهای سنتی، بخش اعظمی از این غذاها با کاهش مصرف روبرو شده‌اند، که بالطبع فلور باکتریایی آن‌ها، که جز فلور بومی و خاص کشور ایران است، در معرض نابودی قرار گرفته است. لذا باید در مورد غذاهای سنتی بومی تحقیقات میکروبی وسیعی به عمل آید تا با بررسی و شناسایی فلور باکتریایی آن‌ها، و نگهداری جدایه‌ها در قالب یک بانک میکروبی مربوط به جدایه‌های بومی، مانع از نابودی آن‌ها شد.

## منابع

وجدانی، ر، و زالی، م. (۱۳۸۲). پروبیوتیک‌ها و مکانیسم اثر آنها در پیشگیری و درمان بیماری‌های انسان. مجله پژوهش در پزشکی، ۲۷ (۴)، ۳۱۹-۳۳۰.

Barakat, O. S., Ibrahim, G. A., Tawfik, N. F., El-Kholy, W. I., & El-Rab, G. D. 2011. Identification and probiotic characteristics of Lactobacillus strains isolated from traditional Domiati cheese. International Journal of Microbiology Research, 3(1), 59.

Chowdhury, T., & Islam, S. 2016. Isolation, identification and determination of probiotic potential of lactic acid bacteria from local curd. Int J Sci Eng Res, 7(4), 263-267.

Tulini, F. L. (2014). Isolation of lactic acid bacteria from milk and cheese with potential for food biopreservation and utilization for increasing whey digestibility (Doctoral dissertation, Doctoral thesis, Universidade de São Paulo (USP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Ribeirão Preto).

## Isolation of lactic acid bacteria from kashk and their screening based on probiotic characteristics

**Bahareh Saboori**

MSc Student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

**Fakhri Shahidi**

Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

**Sara Hedayati**

Assistant professor, Nutrition Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

**Ali Javadmanesh**

Assistant Professor, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

### Abstract

In this research, the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from two kashk samples from Fars (Abadeh city) and Khorasan Razavi (Klat region) provinces has been investigated. MRS and M17 cultures were used to isolate lactic acid bacteria from local kashk. Then, identification of isolated bacteria was done based on morphological, physiological and biochemical characteristics, and PCR was used for molecular identification of lactic acid bacteria isolates. To investigate the probiotic properties of the isolates, cell viability in simulated conditions of the stomach and intestine, resistance to bile salts, resistance to antibiotics, antimicrobial properties, hydrophobicity and cell adhesion were evaluated. The results showed that the isolates were *Enterococcus faecium* KKP. 3772, *Enterococcus faecium* C1, *Pediococcus pentozaceus* H1.1 (KF3), *Lactococcus lactis* Rsg, *Enterococcus faecalis* P190052, *Enterococcus mandeti* CECT972T, *Pediococcus pentozaceus* VNK-1 and *Lactobacillus plantarum* PM411. *Enterococcus mandeti* CECT972T and *Enterococcus faecium* EU428011 were the most sensitive and *Pediococcus pentozaceus* VNK-1 and *Pediococcus pentozaceus* H1.1 were the most resistant isolates to bile salts. The isolates were resistant to tetracycline and sensitive to chloramphenicol and gentamicin. The highest and lowest surface hydrophobicity and self-aggregation were observed in *Pediococcus pentozaceus* VNK-1 (KK4) and *Enterococcus mandeti* CECT972T.

**Keywords:** Kashk, Lactic Acid Bacteria, Probiotic