دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه

جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتریهای پروبیوتیک از محصولات لبنی سنتی مناطق هریس و سراب

اساتید راهنما

دکتر محمد امین حجازی دکتر بهرام ملکی زنجانی

استاد مشاور

مهندس ابوالفضل برزگری

پژوهشگر

حاجیه لطفی

مهرماه88 شماره پایان نامه28287

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

چکیده

پروبیوتیک ها مکمل غذایی از میکروارگانیسم های زنده ای هستند که وقتی در مقادیر مناسب در دستگاه گوارشی وجود داشته باشند، تاثیرات سودمندی بر میزبان برجای می گذارند. از میان باکتریها، باکتریهای اسید لاکتیک، متدوالترین نوع باکتریهایی هستند که به عنوان پروبیوتیک معرفی شده اند. این باکتری ها در محصولات لبنی وجود داشته و در طول مراحل تخمیر، اسید لاکتیک تولید می کنند. همچنین این باکتریها دارای فعالیت پروتئولیتیکی بوده و نقش مهمی در تولید ترکیبات معطر داخل محصولات لبنی و سوبستراهای آنتی بیوتیکی دارند و به همین دلیل محصولات لبنی سنتی از بو وعطر خوبی برخوردار می باشند. با توجه به گسترش فزاینده محصولات لبنی صنعتی بجای محصولات سنتی امکان از دست دادن بسیاری از باکتری های پروبیوتیک وجود دارد بنابراین ضروری است این باکتریها را از منابع سنتی جداسازی و شناسایی نموده و در تولید محصولات لبنی استفاده نمود. شهرستان هریس و سراب یکی از مناطقی می باشند که هنوز بسیاری از محصولات لبنی بصورت سنتی در این شهرستان ها تولید می شوند و محصولات لبنی این مناطق ممکن است دارای باکتری های پروبیوتیک فراوانی باشند بنابراین هدف از این پروژه، جداسازی و شناسایی باکتریهای پروبیوتیک از فلور موجود در ماست و پنیر سنتی مناطق هریس و سراب می باشد. برای رسیدن به این هدف، باکتری های اسید لاکتیک توسط روشهای فنوتیپی(مورفولوژی سلولی، رنگ آمیزی گرم، تست های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی) جداسازی شدند و پتانسیل پروبیوتیکی آنها (مقاومت به اسید معده ، نمک های صفراوی و ...) مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس برای شناسایی دقیق تر با جفت آغازگر های اختصاصی، ژن ***16s rRNA*** باکتری های لاکتوباسیلوس و انتروکوکسی تکثیر داده شده و با استفاده از آنزیم های برشی و مقایسات بیوانفورماتیک تاحدودی تنوع گونه ای باکتری های جداسازی شده مشخص شد. برای شناسایی دقیق تر، قطعات تکثیر یافته در طی واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از وکتور ***pTZ57R/T*** کلون شده و برای توالی یابی ارسال شدند. توالی های بدست آمده با داده های ثبت شده در ***NCBI*** مقایسه شده وگونه های جداسازی شده دارای پتانسیل پروبیوتیکی بطور دقیق تر مشخص شدند. همچنین استفاده از تکنیک ***RAPD*** تنوع داخل گونه های مشخص شده بررسی شد. در پایان تحقیق، 15 سویه لاکتوباسیلوس و 16 سویه انتروکوکوس بعنوان فلور میکروبی طبیعی دارای پتانسیل پروبیوتیکی در محصولات لبنی مناطق هریس و سراب گزارش شدند که کیفیت محصولات لبنی این مناطق را تامین می نمایند و می توان از این سویه ها در محصولات لبنی تولید شده در صنعت استفاده نمود.

کلمات کلیدی: باکتریهای پروبیوتیک، ***16s rRNA, RAPD-PCR***

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

فهرست

چکیده 1

فصل اول: مقدمه و کلیات

1-1- اهمیت پروبیوتیک ها در صنایع غذایی 2

2-1- مفهوم واژه پروبیوتیک 3

1-2-1- میکروارگانیسم های پروبیوتیک 4

2-2-1- انتخاب سویه هایی با پتانسیل پروبیوتیکی 6

3-1- باکتریهای اسید لاکتیک (***LAB***) 6

4-1- میکروارگانیسم های پروبیوتیک در کشت های استارتر 8

1-4-1- پتانسیل پروبیوتیکی موجود در کشت های استارتر سنتی 10

2-4-1- کاربرد باکتریهای پروبیوتیک در تولید ماست های پروبیوتیک 10

5-1- مهمترین ویژگی های سویه های پروبیوتیک به عنوان استارترهای همراه 13

1-5-1- خاصیت آنتی میکروبی 13

1-1-5-1- تولید اسید 13

2-5-1- تولید ویتامینها 16

فصل دوم: بررسی منابع

1-2- جنس لاکتوباسیلوس در یک دیدگاه کلی 18

2-2- جنس انتروکوکوس در یک دیدگاه کلی 20

3-2- شناسایی گونه ها و سویه های باکتریایی 22

1-3-2- شناسایی بر اساس خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی 22

1-1-3-2- شناسایی انتروکوکوس 22

2-1-3-2- شناسایی لاکتوباسیلوس 24

2-3-2- شناسایی بر اساس روش های مولکولی 25

4-2- مفهوم بارکدینگ ***DNA*** 30

1-4-2- سیستم اجرای بارکدینگ ***DNA*** 32

2-4-2- بارکدینگ ***DNA*** و فیلوژنتیک مولکولی 33

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

2-5- کاربرد ***16s rRNA*** و تکنیک های مولکولی در بارکدینگ باکتریهای پروبیوتیک 34

2-6- اهداف تحقیق 39

فصل سوم : مواد و روش ها

3-1- نمونه برداری 41

3-2- تهیه سوسپانسیون باکتریایی و کشت اولیه 41

3-3- غربال جمعیت باکتریایی اولیه و انتخاب ایزوله های مقاوم به اسید 42

3-4- تعیین درصد بقاء ایزوله ها در شرایط اسیدی معادل با شرایط معدی 43

3-5- تعیین مقاومت ایزوله ها به نمکهای صفراوی 45

3-6- شناسایی فنوتیپیکی ایزوله های دارای پتانسیل پروبیوتیکی 45

3-6-1- تست کاتالاز 46

3-6-2- رنگ آمیزی گرم 46

3-6-3- تعیین الگوی تخمیر کربوهیدراتها 47

3-7- شناسایی مولکولی سویه های ایزوله شده 47

3-7-1- استخراج ***DNA*** 47

3-7-2- انجام واکنش پلیمرازی و تشیر قطعه ***16s rRNA*** 49

3-7-3- تفکیک قطعات تکثیر یافته 50

3-7-4- برش آنزیمی ***DNA*** ریبوزومی تکثیر شده با ***PCR*** (***ARDRA***) 51

3-7-5- بررسی تنوع ژنتیکی ایزوله ها در داخل گونه با تکنیک ***RAPD*** 52

3-8- مراحل کلون ژن ***16s rRNA*** جهت توالی یابی 53

3-8-1- تهیه سلول مستعد 53

3-8-2- انجام مرحله اتصال 54

3-8-3- انجام مرحله ترانسفورماسیون 56

3-8-4- استخراج پلاسمید 56

3- 8- 5- جداسازی ژن ***16s rRNA*** از پلاسمید 58

3-9- ارسال پلاسمیدهای استخراج شده جهت توالی یابی 58

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

فصل چهار : نتایج و بحث

4-1- جداسازی سویه های مقاوم به اسید و تعیین مقاومت آنها به اسید 59

4-2- تعیین تحمل ایزوله ها به نمک های صفراوی 61

4-3- شناسایی فنوتیپی باکتریهای انتخاب شده 63

4-4- استخراج ***DNA*** 69

4-5- تکثیر توالی های ***16s rRNA*** ایزله های لاکتوباسیلوس وانتروکوکوس 69

4-6- تهیه نقشه برشی قطعات تکثیر یافته ***DNA*** ریبوزومی ایزوله ها 70

4-7- بررسی تنوع ژنتیکی سویه های انتروکوکوس و لاکتوباسیلوس با استفاده از تکنیک ***RAPD-PCR*** ... 77

4-8- کلونینگ ژن ***16s rRNA*** به وکتور ***pTZR/T*** 81

4-9- استخراج پلاسمید و برش آنزیمی وکتور 82

4-10- بررسی نتایج توالی یابی ایزوله ***L28*** 83

4-11- بررسی نتایج توالی یابی ایزوله ***E29*** 87

4-12- بحث کلی 94

نتیجه گیری کلی و پیشنهادات 103

فهرست منابع و ماخذ .....

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول 1-1 : استارترهای اصلی در ساخت پنیر 9
جدول 1- 2 : طبقه بندی باکتریوسین های تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیک 16
جدول 2-1: جنبه ها سودمندی و ریسک های انتروکوکسی ها در صنایع غذایی 21
جدول 2-2 : 8 گروه انتروکوکوس بر اساس آنالیز ***rRNA*** 29
جدول 2- 3 : نواحی مختلف ژنی برای استفاده در ***DNA*** بارکدینگ 31
جدول 3- 1: غلظت مواد جهت تهیه ***PBS*** 42
جدول 3-2 : غلظت مواد تشکیل دهنده لیز بافر 48
جدول 3-3 : غلظت اجزاء تشکیل دهنده واکنش زنجیره پلیمرازی 49
جدول 3-4 : پرایمرهای مورد استفاده در واکنش ***PCR*** 49
جدول 3-5 : مواد مورد نیاز برای تهیه بافر لودینگ ***6X*** 50
جدول 3-6 : محلولهای مورد نیاز برای الکتروفورز ژل آگارز (***TAE50X***) 51
جدول 3-7 : اجزاء تشکیل دهنده واکنش های هضم آنزیمی 51
جدول 3-8 : غلظت اجزاء تشکیل دهنده ***RAPD-PCR*** 52
جدول 3-9 : پرایمرهای مورد استفاده در ***RAPD-PCR*** 52
جدول 3-10 : مواد مورد نیاز برای آماده سازی ***100cc*** محیط کشت ***LB*** 54
جدول 3-11 : غلظت اجزاء تشکیل دهنده واکنش اتصال 55
جدول 3-12 : محلول های مورد استفاده دراستخراج پلاسمید 57
جدول 3-13 : غلظت و آنزیم های مورد استفاده در برش مضاعف ژن 58
جدول 3-14 : غلظت و آنزیم های مورد استفاده در برش سینگل ژن 58
جدول 4-1 : تعداد ایزوله های جداسازی شده از محصولات لبنی دو منطقه هریس و سراب 59
جدول 4-2 : تعین درصد بقاء ایزوله ها در ***PH=2/5*** به مدت 3 ساعت 59
جدول 4-3 : تعین مقاومت به نمک های صفراوی 62
جدول 4-4 : مشخصات فیزیولوژیکی لاکتوباسیلوس های ایزوله شده با پتانسیل پروبیوتیکی 64
جدول 4-5 : مشخصات بیوشیمیایی لاکتوباسیلوس های ایزوله شده با پتانسیل پروبیوتیکی 64
جدول 4-6 : مشخصات فیزیولوژیکی انتروکوکوس های ایزوله شده با پتانسیل پروبیوتیکی 65
جدول 4-7 : مشخصات بیوشیمیایی انتروکوکوس های ایزوله شده با پتانسیل پروبیوتیکی 65

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

فهرست شکل ها

عنوان صفحه

شکل 1-1 : مسیر متابولیکی استفاده از گلوکز توسط باکتریهای اسید لاکتیک.....7

شکل 2- 1 : ساختار دوم مولکول ***16s rRNA***.....27

شکل 2- 2: اپرون ***rRNA*** در باکتریها و ناحیه جداکننده ***16s-23s***.....28

شکل 2- 3 : روابط فیلوژنتیکی زیرگونه های مختلف جنس انتروکوکوس به وسیله آنالیز توالی ژن ***16s rRNA***...29

شکل 2- 4 : ***DNA*** بارکدینگ در مقایسه با روابط فیلوژنی ژنتیک جمعیت.....30

شکل 2- 5 : اجزای اصلی بارکد در پروژه ***life*** و ارتباط آن با روابط تاکسونومیکی.....32

شکل 3- 1 : مراحل رقت سازی جهت تعیین ***CFU***.....44

شکل 3-2 : برنامه زمان بندی واکنش زنجیر ای پلیمرازی.....50

شکل 3-3 : برنامه زمان بندی واکنش ***RAPD-PCR***.....53

شکل 3-4 : وکتور ***pTZR/T*** و جایگاه های برش آنزیمی.....55

شکل 4- 1 : الکتروفرورز استخراج ***DNA*** از ایزوله ها.....69

شکل 4- 2: الکتروفورز محصولات تکثیری توالی های ***16s rRNA*** برای ایزوله های انتروکوکوس.....70

شکل 4- 3 : الکتروفورز محصولات تکثیری توالی های ***16s rRNA*** برای ایزوله های لاکتوباسیلوس.....70

شکل 4- 4 : الگوی برشی محصولات ***PCR*** لاکتوباسیلوس ها با آنزیم ***TaqI*** و مقایسه بیوانفورماتیکی با الگوهای برشی توالی ***16s rRNA*** گونه های لاکتوباسیلوس های ثبت شده در بانک ژنی.....73

شکل 4- 5 : الگوی برشی محصولات ***PCR*** لاکتوباسیلوس ها با آنزیم ***MspI*** و مقایسه بیوانفورماتیکی با الگوهای برشی توالی ***16s rRNA*** گونه های لاکتوباسیلوس های ثبت شده در بانک ژنی.....74

شکل 4- 6 : الگوی برشی محصولات ***PCR*** انتروکوکوس ها با آنزیم ***TaqI*** و مقایسه بیوانفورماتیکی با الگوهای برشی توالی ***16s rRNA*** گونه های انتروکوکوس های ثبت شده در بانک ژنی.....75

شکل 4- 7 : الگوی برشی محصولات ***PCR*** با آنزیم ***MspI*** و مقایسه بیوانفورماتیکی با الگوهای برشی توالی ***16s rRNA*** گونه های لاکتوباسیلوس های ثبت شده در بانک ژنی.....76

شکل 4- 8 : الگوی باندی به دست آمده از تکثیر کل ژنوم سویه های انتروکوکسی با استفاده از آغازگر ***oPFo2***.78

شکل 4- 9 : الگوی باندی به دست آمده از تکثیر کل ژنوم سویه های لاکتوباسیلوس با استفاده از آغازگر ***p8***.....78

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

شکل 4- 10 : کلونی های سفید و آبی رنگ بعد از مرحله ترانسفورماسیون.....81

شکل 4- 11 : الکتروفورز استخراج پلاسمید ایزوله ***L28***.....82

شکل 4- 12 : برش آنزیمی پلاسمید دارای ژن ***16s rRNA***.....82

شکل 4- 13 : پیک های مربوط به سویه ***L28*** توالی یابی شده 84

شکل 4- 14 : ***Align*** توالی ایزوله ***L28*** با سویه های موجود در ***NCBI***.....85

شکل 4- 15: ***Align*** دو رشته ***plus*** مربوط به توالی یابی توالی ***16s rRNA*** ایزوله ***L28*** با استفاده از برنامه بیوانفورماتیکی ***BLAST*** در ***NCBI***.....87

شکل 4- 16: ***Align*** ایزوله ***E29*** با توالی ***16s rRNA*** انتروکوکوس هیرا ثبت شده در بانک ژنی 90

شکل 4- 17 : بلاست توالی ژن ***16s rRNA*** ایزوله ***E29*** با توالی موجود در بانک اطلاعاتی و نمایش نوکلئوتیدی تغییر یافته نسبت به توالی موجود در بانک اطلاعات ژنی 91

شکل 4- 18 : بلاست توالی ژن ***16s rRNA*** ایزوله ***E29*** با توالی موجود در بانک اطلاعاتی و نمایش نوکلئوتیدی تغییر یافته نسبت به توالی موجود در بانک اطلاعات ژنی 92

شکل 4- 19 : بلاست توالی ژن ***16s rRNA*** ایزوله ***E29*** با توالی موجود در بانک اطلاعاتی و نمایش نوکلئوتیدی تغییر یافته نسبت به توالی موجود در بانک اطلاعات ژنی 93

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

فهرست نمودارها

عنوان صفحه

نمودار 4-1 : تاثیر محیط اسیدی ***PBS*** با ***PH=2/5*** در لحظه صفر و بعد از 3 ساعت.....60

نمودار 4-2 : تاثیر نمک های صفراوی بر روی رشد سویه های ***L6 , L3***.....62

نموار 4-3 : دندروگرام مربوط به تحلیل آماری تست های بیوشیمیایی لاکتوباسیلوس ها با استفاده از برنامه ***NTSYS*** و روش ***UPGMA***.....67

نمودار 4-4 : دندروگرام مربوط به تحلیل آماری تست های بیوشیمیایی انتروکوکسی ها با استفاده از برنامه ***NTSYS*** و روش ***UPGMA***.....68

نمودار 4-5 : دندروگرام حاصل از ***RAPD-PCR*** برای ایزوله های انتروکوکسی.....79

نمودار 4-6 : دندروگرام حاصل از ***RAPD-PCR*** برای ایزوله های لاکتوباسیل.....80

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

1-1- اهمیت پروبیوتیک ها در صنایع غذایی

بیوتکنولوژی را می توان استفاده از موجودات زنده برای تبدیل یک ماده کم ارزش به یک ماده پر ارزش و یا تولید یک ماده با ارزش غذایی و دارویی در جهت منافع انسانی تعریف نمود. یکی از کاربردهای مهم بیوتکنولوژی افزایش کیفیت و تولید محصولات غذایی با ارزش می باشد.

امروزه تنوع بسیار زیادی از محصولات غذایی تولید شده با استفاده از فناوری زیستی وجود دارد. به عنوان مثال در سال 2003 ارزش بازار جهانی امولسیون کننده های غذایی بیش از یک میلیارد دلار بوده است که در این بین لیسیتین (پرمصرفترین امولسیفایر غذایی) که یکی از فرآورده های مهم بیوتکنولوژی به شمار می رود به تنهایی رقمی بیش از 250 میلیون دلار را به خود اختصاص داده است. در حال حاضر با استفاده از میکروارگانیسمها و روشهای بیوتکنولوژی سالانه بیش از 270000 تن اسید سیتریک به ارزش حدود 1/4 میلیارد دلار در جهان تولید می شود که بخش اعظم آن در صنایع غذایی به مصرف می رسد. همچنین در بازار جهانی، پروبیوتیکهای مورد استفاده در صنایع تولید مواد غذایی مانند ماست های پروبیوتیک، افزودنیهای غذایی و فرمولاسیونهای دارویی از ارزش بسیار بالایی برخوردار هستند. برای مثال میزان فروش سالیانه ماست های حاوی پروبیوتیک در جهان رقمی حدود 10 میلیارد دلار را به خود اختصاص می دهد. در حال حاضر تنها در اتحادیه اروپا ارزش محصولات تولیدی در زمینه بیوتکنولوژی غذایی (محصولات غذایی تخمیری اسیدهای آمینه ویتامینها و غیره) بیش از 25 میلیارد دلار برآورد شده است. در صنایع غذایی پروبیوتیک ها به عنوان اجزایی از محصولات لبنی تخمیر شده مثل ماست و نیز نوشیدنی هایی مثل یاکولت مصرف می شوند. امروزه بیش از 70 محصول دارای باکتریهای زنده اسید لاکتیکی از جمله خامهٔ ترش، ماست، شیر پودر شده و کره در سرتاسر جهان تولید و عرضه می شود(1).

پروبیوتیک ها به طور افزاینده ای به عنوان مکمل های رژیمی به صورت قرص، کپسول و آمایش های خشک شده به روش انجمادی به بازار عرضه می شوند(63). اخیراً، آزمون های بالینی اثرات

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

سودمند و پیشبرنده سلامتی باکتریهای پروبیوتیک را که به غذاهای انسانی و حیوانی وارد شده انـد را نشان داده است. این اثرات شامل پیشگیری از اسهال، متعادل کردن میکروفلور روده، تحریک سیستم ایمنی، تعدیل هموستازی ایمنی سیستمیک، خصوصیات ضد توموری، و اصلاح عدم تحمل لاکتوز می باشد(63). علاوه برتاثیرات سودمند پروبیوتیک ها در سلامتی، محققان نشان داده اند کـه باکتریهـای پروبیوتیک با تولید باکتریوسین ها و اسیدهای آلی به عنوان ضد میکـروب، رشـد پـاتوژن هـا را مهـار نموده و همچنین عملکرد سلولهای اپی تلیال روده ای را بهتر می کنند(63). به این دلیل برای بهبـود ارزش تغذیـه ای محصـولات لبنـی، تحقیقـات متعـددی در راسـتای جداسـازی و بررسـی پتانسـیل پروبیوتیکی میکروارگانیسم ها از منابع لبنی سنتی درحال انجام است. بخشی از این مطالعات بـر روی شناسایی میکروارگانیسمها به روش مولکولی، بیوشیمیایی و تعیین مقاومت سویه ها به اسـید و نمـک های صفراوی می باشد.

2-1 - مفهوم واژه پروبیوتیک

پروبیوتیک یا عامل شفادهنده زیستی یک موجود زنده است کـه بـا ایجـاد اخـتلال در عملکـرد پاتوژنها در حفظ سلامت میزبان بسیار موثر مـی باشـد. واژۀ پروبیوتیـک از واژه یونـانی پروبیـوس بـه معنای برای زندگی گرفته شده است(75).

تاکنون تعریف های متعددی از پروبیوتیک ها ارائه شده است، که با توجه به گسترش تحقیقات و اثبات اثرات متعدد سودمند پروبیوتیک ها در تعادل میکروبی سودمند، جمعیت نرمال یا تثبیت فلور روده ای تعریف پروبیوتیک ها در حال تغییر است(61). یک تعریف جامع و تا حـدودی کلـی کـه بـه وسیله دانشمندان آلمانی پیشنهاد شده است، بیان می کند که پروبیوتیـک هـا میکروارگانیسـم هـای زنده ای هستند که وقتی با مقادیر مناسب به روده برسـند، اثـرات مثبـت اعمـال خواهنـد کـرد(61).

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

آخرین تعریف به منظور مصارف انسانی توسط سالمنین[1] و همکارانش در سال 1998 پیشنهاد شده است؛ آنها پروبیوتیکها را یک اجزاء زنده میکروبی غذا عنوان کردند که برای سلامتی سودمند است(61). طبق تعریف ***FAO/WHO*** پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که وقتی به مقدار کافی مصرف شوند سلامتی را به میزبان اعطا می کنند. مفهوم امروزی پروبیوتیک عبارت است از میکروارگانیسم های زنده ای که با قرار گرفتن در محیط روده می توانند تعادل میکروبی را در جهت افزایش سودمندی آنها اصلاح کنند و با فعالیت خود مانع از فعالیت میکروارگانیسم های غیر مفید و بیماریزا شوند(43).

1-2- 1- میکروارگانیسم های پروبیوتیک

در میان مهمترین میکروارگانیسم های پروبیوتیک، باکتریهای اسید لاکتیک قرار دارند که با دستگاه گوارشی انسان مرتبط هستند. تعداد زیادی از جنس ها و گونه های میکروبی به عنوان پروبیوتیک مطرح می باشند که از جملهٔ آنها می توان به گونه هایی از جنس های لاکتوباسیلوس[2]، بیفیدوباکتریوم[3]، انتروکوکوس[4]، لاکتوکوکوس[5]، لوکونوستوک[6]، پدیوکوکوس[7]، اسپورولاکتوباسیلوس، استرپتوکوکوس و باکتریهای غیر اسید لاکتیکی مثل باسیلوس سرئوس، پروپیونی باکتریوم، و مخمر ساکارومایسس اشاره کرد . با این وجود در رابطه با مواد غذایی، آن دسته از سویه هایی که به عنوان باکتریهای اسید لاکتیکی طبقه بندی می شوند، از اهمیت فراوانی برخوردار هستند. بنابراین باکتریهایی که در این تحقیق جداسازی و شناسایی خواهند شد مربوط به باکتریهای اسید لاکتیک و

[1] ***Saleminen***
[2] ***- Lactobacillus***
[3] ***- Bifidobacterium***
[4] ***- Enterococcus***
[5] ***- Lactococcus***
[6] ***- Leoconostoc***
[7] ***- Pediococcus***

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

متعلق به دو جنس لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس می باشد که جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش و مواد غذایی تخمیر شده می باشند و کاندیداهای خوبی برای پروبیوتیک بودن به حساب می آیند.

فاکتورهای کلیدی برای انتخاب یک سویه کاربردی پروبیوتیک که در جریان جداسازی باید به آن توجه کرد عبارتند از :

1- صفات عمومی مثل منشاء، هویت و مقاومت به جهش ها.

2- خصوصیات تکنیکی (ویژگیهای رشد در شرایط ***in vitro*** و در طول فرآوری، بقاء و حفظ زندگی در طول حمل و نقل یا نگهداری).

3- ویژگیهای فیزیولوژیکی کلی (مقاومت بر علیه تنش های محیطی و عوامل ضد میکروبی موجود در دستگاه گوارش فوقانی که در طول عبور از معده ـ دوازدهه مواجه می شوند [***PH=2.5*** مایع معدی، اسید صفراوی، مایع پانکراتیک] و پتانسیل چسبندگی به اپی تلیوم روده ای) .

4- صفات کاربردی و سودمند (پتانسیل چسبندگی و کلونیزه شدن به موکوس، قابلیت رقابت با سایر باکتریها، خاصیت ضد میکروبی اختصاصی بر علیه باکتریهای بیماریزا، تحریک پاسخ ایمنی، تحریک انتخابی باکتریهای همزیست و ایجاد احیاء جمعیت میکروبی نرمال).

5- جنبه های ایمنی (عدم پتانسیل تهاجمی، نداشتن ژنهای قابل انتقال بر علیه آنتی بیوتیکهای درمانی و نداشتن فاکتورهای ویرولانس)(25، 41).

روش های زیر برای ارزیابی سالم بودن پروبیوتیکها و سویه های استارتر بوسیله سالمینن و همکارانش در سال 2000 توصیه شده است:

• مشخص کردن جنس، گونه، سویه و منشاء سویه های پروبیوتیک و استارتر که ارزیابی اولیه از سالم بودن آن را مهیا خواهد کرد.

• مطالعه صفات داخلی و فاکتورهایی با پتانسیل ویرولانسی برای هر سویه اختصاصی

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

• مطالعه چسبندگی، پتانسیل تهاجمی و فارماکوکنتیک هر سویه

• مطالعه واکنش های بین سویه، روده ، میکروفلور موکوسی و میزبان(64).

1-2- 2- انتخاب سویه هایی با پتانسیل پروبیوتیکی

اولین قدم در معرفی سویه های پروبیوتیک جدید، جداسازی و انتخاب سویه های مناسب از یک جمعیت میکروبی متنوع می باشد. این کار بوسیلهٔ جستجو در مجموعه بانک های سلولی، جداسازی از محصولات لبنی سنتی و یا جداسازی از انسان ها و حیوانات سالم انجام می گیرد(46). ابتدا جداسازی سویه ها با کشت آنها در شرایط آزمایشگاهی آغاز شده و سپس مرحلهٔ شناسایی بهترین سویه های پروبیوتیکی با روشهای ساده ***In vitro*** با ایجاد شرایطی مثل دستگاه گوارشی و اپی تلیوم روده ای انجام می شود(46). مهمترین آزمونهای شناسایی بیوشیمایی عبارتند از : تحمل به اسید و نمکهای صفراوی(24)، مدلهای ***in vitro*** چسبندگی(53)، آزمونهای ***in vitro*** بر علیه باکتریهای بیماریزا(32)، تستهای ایمنی(14) ، آزمونهای ایمنی(38)، راکتورهای مدل روده ای(49).

1-3- باکتریهای اسید لاکتیک[1] ***(LAB)***

باکتریهای اسید لاکتیک به عنوان باکتریهای گرم مثبت، فاقد اسپور، کاتالاز منفی، فاقد سیتوپلاسم ، متحمل به اسید و غیر هوازی اختیاری هستند که محصول نهایی آنها در طول تخمیر کربوهیدرات ها، اسید لاکتیک است. به علت پیچیده بودن نیاز های تغذیه ای باکتریهای اسید لاکتیک، این باکتری ها در طبیعت بسیارگسترده هستند. محیط هایی که برای زندگی ترجیح می دهند غالباً غنی از هیدرات کربن، قطعات شکسته شده محصولات پروتئینی، ویتامینها و محیطی با اکسیژن کم است(70).

[1] ***Lactic acid bacteria***

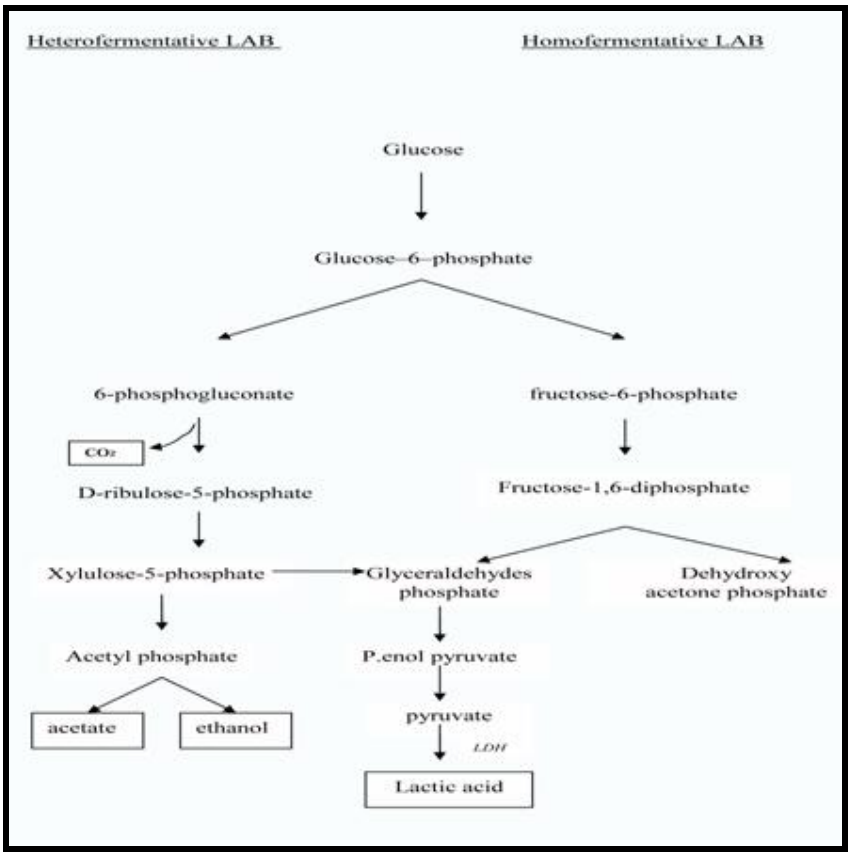
PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

با توجه به متابولیسم کربوهیدرات، باکتریهای اسید لاکتیک به داخل دو گروه اصلی تقسیم بندی می شوند:

1- ***Homofermentative LAB*** : فقط اسید لاکتیک تولید می کنند.

2- ***Heterofermentative LAB*** : اسید لاکتیک ، کربن دی اکسید ، اتانول و استیک اسید تولید می کنند.

شکل 1-1 نشان دهنده مسیر متابولیکی کربوهیدارت این دو گروه از باکتریها است. همانگونه که مشاهده می شود باکتریهای هموفرمنتیتیو از مسیر گلیکولیز و باکتریهای هتروفرمنتیتیو از مسیر 6 فسفوگلوکونات / فسفوکتولاز استفاده می کند.(66) .



شکل 1-1: مسیر متابولیکی استفاده از گلوکز توسط باکتریهای اسید لاکتیک

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

باکتریهای اسید لاکتیک شامل 11 جنس هستند اما فقط 6 جنس با محصولات لبنی در ارتباط هستند.که این 6 جنس عبارتند از : لاکتوکوکوس، انتروکوکوس، استرپتوکوکوس، لوکونوستوک، پدیوکوکوس و لاکتوباسیل(5). میکروفلور موجود در ماست و پنیر در دو گروه قرار دارند. گروه اول شامل فلور استارتر است که به باکتریهای اسید لاکتیک استارتر مربوط می شود و گروه دوم شامل باکتریهای اسید لاکتیک غیر استارتر، پروبیونیک، کپک ها و مخمرها هستند(7) .

1-4- میکروارگانیسم های پروبیوتیک در کشت های استارتر

اساساً تولید محصولات تخمیری با استفاده از کشت های استارتر اصلی و کشت های همراه صورت می گیرد. کشت های همراه موجب افزایش خصوصیات پروبیوتیکی در محصولات لبنی می شود. طبق تعریف ویگلی در سال 1999 کشتهای استارتر عبارتند از به کارگیری یک یا چند سویه میکروبی در محصولات لبنی به منظور افزایش کیفیت شیر تخمیری و تولید ترکیبات موثر در مزه و طعم محصولات تولید شده از شیر. کشت های استارتر قبل از مصرف در تولیدات تجاری باید در محیط های اصلی رشد مانند شیره قند، شیره غلات رشد داده شوند. ویتامینها به خصوص ویتامین ***B*** و برخی از اسید آمینه ها جهت رشد بهینه استارترها ضروری هستند. کشت های استارتر برای تولید صنعتی انواع محصولات لبنی تخمیری مانند ماست و پنیر به کار گرفته می شوند. بر اساس تحقیقات کوگان[1] در سال 1996، کشت های استارتر قبل از تلقیح در محیط های حاوی شیر رشد داده می شوند بسته به نوع پنیر حجم تلقیح از 0/2 درصد تا 2 درصد نسبت به حجم کل شیر متفاوت است. هر ساله تقریبا $12/5 \times 10^{10}$ تن شیر جهت ساخت $12/5 \times 10^{6}$ تن پنیر در سراسر جهان استفاده می

[1] ***Cogan***

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

شود. اگر فرض شود حجم تلقیح 0/5 درصد باشد برای هر پنیری حجم استارتر 10^8 × 6/3 لیتر نیاز است(15).

برخی از سویه هایی که به عنوان استارهای اصلی در ساخت پنیر استفاده می شود در جدول1-1 آورده شده است .

جدول 1-1- استارترهای اصلی در ساخت پنیر

سویه استارتر	نوع پنیر
لاکتوباسیلوس بولگاریس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس	***Parmesan , Romano***
لاکتوباسیلوس بولگاریس ، لاکتوباسیلوس لاکتیس ، لاکتوباسیلوس هلونتیکوس	***Swiss , Emmental***
استرپتوکوکوس ترموفیلوس ، سویه های لاکتوباسیلوس	***muenster***
لاکتوباسیل های مقاوم به حرارت ، استرپتوکوکوس ترموفیلوس	***Mozzeralla***

در محصولات لبنی کشتهای استارتر مزوفیلیک، ترموفیلیک و سنتی به کار می روند(5). در کشتهای استارتر مزوفیلیک از باکتریهای اسید لاکتیکی که در دمای 30 درجه سانتیگراد رشد مطلوبی دارند، استفاده می شود مانند سویه های مختلف لاکتوکوکوس. در کشت های مزوفیلیک از دو جنس لاکتوباسیلوس و استرپتوکوکوس استفاده می شود. در سال1991 شلیفر و همکارانش سویه های لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس ولاکتوباسیلوس هلونتیکوس را به عنوان استارترهای تجارتی معرفی کردند(66).

گزارشات مایرا[1] در سال 1998 نشان می دهد که علاوه بر لاکتوباسیل ها، از میان 27 سویه استرپتوکوکوس تنها استرپتوکوکوس ترموفیلوس به عنوان استارتر به تولیدات غذایی افزوده می شود. زیرا استرپتوکوکوس ترموفیلوس به همراه لاکتوباسیلوس دلبروکی قادر به تجزیه و استفاده از گالاکتوز

[1] ***mayra***

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

و لاکتوز می باشد(50). از میان کشت های استارتر، کشت های استارتر سنتی پتانسیل بالای پروبیوتیکی را شامل هستند.

1-4-1- پتانسیل پروبیوتیکی موجود در کشت های استارتر سنتی[1]

در این نوع کشت ها از محصولات لبنی تخمیری که قبلا تهیه و در بسته بندی هایی نگهداری شده است به عنوان استارتر استفاده می شود. برای مثال تولید برخی از پنیرهای ایتالیایی و سوئیسی با آب پنیر از قبل تهیه شده با توجه به دمای تلقیحی و ***pH*** پایین به عنوان استارتر به شیر اضافه می شود. تجزیه آب پنیر توسط اکسولون[2] در سال 1998 نشان داد که آب پنیر دارای ترکیبات مختلفی است و سویه های مختلفی همزمان می تواند در این نوع استارتر وجود داشته باشد. لوپز[3] در سال 2000 گزارش کرد که سویه های انتروکوکوس فراوانترین و غالبترین میکروارگانیسم موجود در پنیرهای سنتی که از شیر خام ساخته شده اند، است. این باکتری ها دارای تاثیراتی مانند تولید سریع اسید، تحمل به دماهای بالا، تحمل به غلظتهای مختلف نمک می باشد(5). تحقیقات لوپز در سال 2000 تایید کرد که انتروکوکوس فکالیس برای سرعت بخشیدن به رسیدن پنیر و مطلوب کردن ویژگی های شیمیایی آن موثر است. همچنین به علت دارا بودن خاصیت تجزیه پروتئین توسط انتروکوکوس فکالیس رشد دیگر سویه های باکتریهای اسید لاکتیک در محصولات لبنی افزایش می یابد(47).

[1] ***Artisanal***
[2] ***Axelsson***
[3] ***Lopez***

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

1-4-2- کاربرد باکتریهای پروبیوتیک در تولید ماست های پروبیوتیک

طبق تحقیقاتی که شاه[1] و همکارانش در سال 2003 انجام دادند، ماست های موجود در بازار با توجه به ترکیبات شیمیایی، روش تولید، مزه و طعم، انواع مراحل پاستوریزاسیون تقسیم بندی می شوند(68).

در ترکیبات ماست هایی که در زمان های قدیم بیشتر تولید می شد از گیاهان خوشبو یا قطعات ریز شده میوه ها برای افزایش طعم و عطر استفاده می کردند. امروزه نیز با افزودن ترکیبات رنگی و شیرین کننده ها ماست هایی با طعم های متفاوت تولید می شود. اما گروه جدیدی از ماست های تولیدی به نام ماست های پروبیوتیک هستند. این ماست ها با بکارگیری باکتریهای اسید لاکتیک به صورت کشتهای استارتر تولید می شوند و مهم ترین ویژگی این ماست ها بهبود هضم توسط دستگاه گوارش و سیستم ایمنی بدن می باشد. مهم ترین باکتریهایی که در کشتهای استارتر ماست به کار می روند عبارتند از : لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریس، استرپتوکوکوس ترموفیلیک، لاکتوباسیلوس ***GG***، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس رئوتری(68).

طبق تحقیقات روبینسون[2] در سال 2002 دو باکتری اصلی از ماست گزارش شده است که عبارتند از: استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریس. امروزه این دو باکتری مهمترین استارترهای ماست به شمار می آیند زیرا هم با سرعت بالایی در شیر رشد دارند و هم با تولید اسید لاکتیک موجب کاهش اسیدیته شیر می شوند. همچنین با تجزیه پروتئین های شیر موجب تولید ترکیبات معطر و بستن شیر می شوند. در برخی کشورها طبق قانون باید لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریس به عنوان استارتر به ماست ها افزوده شود که مشهورترین محصول بنام ***yoghoyrt*** به بازار عرضه می شود. همچنین در برخی کشورها مانند استرالیا افزودن لاکتوباسیلوس هلونتیکوس و لاکتوباسیلوس جوگورتی الزامی می باشد(59).

[1] ***shah***
[2] ***robinson***

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com

با افزودن استارترها به ماست رسوب کازئین در نتیجه افزایش اسیدیته صورت می گیرد. کازئین در ***pH*** برابر با 4/5 ناپایدار می شود و در ***pH*** برابر با 4/6 رسوب می کند که دقیقا برابر با نقطه ایزوالکتریک کازئین است. نقش اصلی استارترها در طی مراحل ساخت محصولات لبنی تولید اسید لاکتیک از لاکتوز و پایین آوردن ***pH*** به کمتر از4/5 در طول 4 ساعت می باشد. علاوه بر این، خصوصیات مربوط به مزه و طعم ماست های پروبیوتیکی توسط تولیدات متابولیتی باکتریهای لاکتوباسیلوس و استرپتوکوکوس به صورت همزمان ایجاد می گردد. برای مثال استالدئید در مقدار بیشتر از 40 میلیگرم در کیلوگرم عامل اصلی در ایجاد طعم و مزه مطلوب به شمار می آید. همچنین فعالیت تجزیه پروتئینی لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریس برای تولید استالدئید حائز اهمیت است زیرا ترئونین از فعالیت پپتیدازی لاکتوباسیل ها حاصل می شود. ترکیبات دیگری که در تولید مزه و طعم مطلوب درگیر هستند عبارتند از : دی استیل، استون، استوئین، اسیدهای ارگانیک مانند: استیک، اسید لاکتیک، اسید چرب، اسیدهای آمینه آزاد(13).

ویژگی دیگری که توسط باکتریهای پروبیوتیک در ماست ها ایجاد می شود و از طرفی اهمیت زیادی برای مصرف کنندگان دارد، ویسکوزیته ماستهای بدون چربی می باشد. لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس اگزوپلی ساکارید زیادی را تولید می کنند و ویسکوزیته ماست را با اتصال به آب آزاد و ممانعت از شکستن حالت ژلی افزایش می دهند.

از نظر کراو و کوری [1] در سال 2001 تشکیل اگزوپلی ساکارید بسته به فاکتورهای زیادی دارد که مهمترین آنها عبارتند از : دما، ***pH*** ، ویتامینها، فاز رشدی، منبع کربوهیدراتی، سویه استفاده شده. اگزوپلی ساکارید از گلوکز و گالاکتوز و رامنوز تشکیل شده است که با تغییرات کونفورماسیونی و واکنش با کازئین در ***pH*** پایین پلیمرهای گلیکوهیدرولازی را تجزیه می کند(17).

[1] ***Crow & cury***

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version http://www.pdffactory.com