JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره یازدهم، شماره دوم، ۱۳۹۴، پیاپی ۳۱: ۹۰-۷۹

جداسازی و شناسایی گونه‌های *انتروکوکوس* جداشده از شیر خام شتر تک کوهانه ایرانی (*Camelus dromedarius*) و بررسی خواص تکنولوژیکی آن

نفیسه دعوتی[۱]، فریده طباطبایی یزدی[۲]، سعید زیبائی[۳*]، فخری شهیدی[۴]، محمدرضا عدالتیان[۵]

۱- دانشجوی دکترای میکروبیولوژی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی شعبه شمال شرق، مشهد، ایران

۴- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۵- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۷ فروردین ۱۳۹۳ *تاریخ پذیرش: ۳۱ خرداد ۱۳۹۳*

چکیده

هدف این مطالعه شناسایی اجتماع انتروکوکوسی شیر شتر تک کوهانه ایرانی (Camelus dromedarius) و بررسی خواص تکنولوژیکی آنها می‌باشد. پانزده باکتری از شیر شتر منطقه گلستان جداسازی گردید. لگاریتم تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی انتروکوکوس‌ها روی محیط KAA تحت شرایط بی‌هوازی در دماهای ۲۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۰/۰۵± ۵/۸۱۶ ، ۰/۰۲± ۶/۳۹۷ و ۰/۱۴±۸/۰۱۷ (انتروکوکوس‌های ترموفیل غالب است بود. شناسایی جدایه‌ها براساس خواص فنوتیپکی و بیوشیمیایی شامل انتروکوکوس دورانس، انتروکوکوس موندتی، انتروکوکوس فسیوم، انتروکوکوس دوریس، انتروکوکوس آویوم و انتروکوکوس فکالیس بود. این شناسایی توسط روش مولکولی بر اساس تکثیر ژن 16S rRNA با پرایمرهای یونیورسال B27F و U1492R و سپس توالی یابی محصول PCR مربوطه تایید شد. بررسی خواص تکنولوژیکی جدایه‌ها نشان داد که تمامی آن‌ها قابلیت بالایی در تولید اسید داشته و دارای فعالیت لیپولیتیکی می‌باشند. انتروکوکوس فکالیس بیشترین فعالیت لیپولیتیکی را نسبت به سایر جدایه‌ها نشان داد. انتروکوکوس فسیوم و انتروکوکوس فکالیس بیشترین میزان اتولیز شدن را در بین سایر نمونه‌ها نشان دادند. براساس بررسی خواص تکنولوژیکی جدایه‌ها، انتروکوکوس‌های شیر شتر کاندیداهای مناسبی برای فراوری شیر شتر و سایر محصولات لبنی دیگر محسوب می‌شوند.

کلمات کلیدی: شتر، *انتروکوکوس*، لیپولیتیک، اتولیتیک، پروتئولیتیک

**نویسنده مسئول: سعید زیبائی*

آدرس: استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی شعبه شمال شرق، مشهد، ایران. تلفن: ۰۹۱۵۳۰۴۵۹۱۹

پست الکترونیک: zibaee@mrazi.ac.ir

مقدمه

از گذشته تا به امروز باکتری‌های اسید لاکتیک نقش مهمی در ایجاد عطر، طعم، بافت، افزایش زمان ماندگاری و خواص درمانی در فرآورده‌های لبنی تخمیری داشته‌اند. شیر حیوانات اهلی یکی از منابع تامین کننده خانواده بزرگ اسید لاکتیک باکتری‌ها بوده وشیر شتر یکی از منابع ارزشمند در این زمینه می-باشد. شیر شتر غذای اصلی ساکنین صحرا و بادیه نشین را تشکیل داده و تاحدودی ملل آسیای میانه، شبه جزیره عربستان و آفریقا از دیرباز تاکنون در تغذیه خود متکی به شیر شتر بوده‌اند. ترکیبات شیر شتر دارای فعالیت‌های ضدویروسی و ضدباکتریایی می‌باشد. شیر تخمیر شده شتر در درمان سل و بیماری‌های انگلی تاثیر داشته و قابلیت هضم بهتر و اسیدیته بیشتری نسبت به شیر دارد. فلور میکروبی آن حضور پایداری در دستگاه گوارش داشته و فرایندهای هضم دستگاه گوارش را تنظیم و تحریک می کند (۱۶و۱). در بسیاری کشورها شیر نجوشیده شتر به مدت چند روز در دمای محیط نگهداری می‌شود تا به وسیله تخمیر خود به خودی ترش شده و به فرآورده دوغ تبدیل شود. ولی به دلیل عدم کنترل کیفیت دارای طعم و مزه متغیر بوده و از کیفیت بهداشتی پایینی برخوردار می‌باشد. این تخمیر سنتی خودبه خودی می‌تواند توسط افزودن اسیدلاکتیک باکتری‌های ذاتی جداسازی شده از این اکوسیستم کنترل گردد (۱۰). در بین باکتری‌های اسید لاکتیک *انتروکوکوس*ها دارای توانایی بالایی در تولید انتروسین به عنوان یک باکتریوسین می‌باشند. انتروسین-ها توسط *انتروکوکوس ماندتی*، *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فسیوم* تولید می‌شوند. باکتری‌های جنس *انتروکوکوس* از لحاظ تولید اسید نسبتا خوب تا متوسط عمل کرده، فعالیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی داشته ولی بالا نمی باشد بنابراین بهتر است به عنوان استارتر کالچر الحاقی در ترکیب با استارترها استفاده شود زیرا تحقیقات ثابت کرده است که بر روی رنگ، آروما، بافت، طعم و در کل رسیدگی پنیر اثر مثبتی دارد. از اینرو در مطالعه‌ای که بر روی جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از شیر شتر تک کوهانه ایرانی به هدف تثبیت و کنترل کیفیت محصولات تخمیری این فرآورده باارزش انجام شد، جداسازی *انتروکوکوس*ها به عنوان باکتری‌هایی مهم در صنعت لبنی یکی از اهداف مطالعه بوده است.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری و جداسازی باکتری‌های *انتروکوکوس*

ابتدا از شیر شتر تک کوهانه استان گلستان تحت شرایط استریل نمونه‌برداری شد.سپساز رقت‌های سریالی تهیه شده از نمونه (10^{-3} تا 10^{-5}) بر روی محیط KAA[1]کشت سطحی انجام گردید و تحت شرایط بی-هوازی (جار بی‌هوازی وگاز پک نوع A) در دمای ۲۰°C، ۳۷ و ۴۵به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری گردید. کلنی‌های حاصل شده بر روی محیط KAA که قادر به هیدرولیز اسکولین و تغییر رنگ محیط به سیاه بودند به عنوان مشکوک به *انتروکوکوس* شمرده شدند. کلنی‌هایی که از نظر شکل ظاهری و تحدب با هم اختلاف داشتند به طور تصادفی انتخاب شده و به وسیله کشت خطی خالص سازی شدند. کلنی‌های خالص سازی شده از نظر مشاهده میکروسکوپیکی، آزمون کاتالاز و رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌های (ایزوله‌های) کوکسی که از نظر تست کاتالاز، منفی و رنگ آمیزی گرم، مثبت ارزیابی شدند

[1]Kanamycin Aesculin Azide agar

جهت شناسایی تا سطح جنس *انتروکوکوس* به لحاظ قابلیت رشد در در غلظت ۶/۵ درصد کلرید سدیم، دو دمای ۱۵ °C و ۴۵ °C، pH های ۴/۴ و ۹/۶ و عدم تولید گاز دی‌اکسید کربن از گلوکز مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۶).

شناسایی جدایه‌ها تا سطح گونه

جدایه‌های تایید شده در جنس *انتروکوکوس* از مرحله قبل، براساس پروفایل تخمیر کربوهیدرات‌ها (ان-استیل گلوکز آمین، آمیگدالین، دی-آرابینوز، ال-آرابیتول، آربوتین، سلوبیوز، دولسیتول، دی-فروکتوز، دی-فوکوز، گالاکتوز، بتا-جینتوبیوز، گلوکونات، دی-گلوکز، گلیسرول، گلیکوژن، اینوزیتول، ۲-کتوگلوکونات، لاکتوز، دی-لیکسوز، مالتوز، مانیتول، دی-مانوز، ملیبیوز، دی-رافینوز، رامنوز، سوربیتول، نشاسته، ساکروز، تری‌هالوز، گزیلیتول، دی-گزیلوز، ال-گزیلوز دی- آرابیتول، اینولین، ملی‌زیتوز، ریبوز، ال-سوربوز)، *تولید* استوئین، هیدرولیز اسکولین و نشاسته‌ها سطح گونه مورد شناسایی قرار گرفتند. تخمیر کربوهیدرات‌ها در MRS براث بدون قند حاوی ۱٪ محلول کربوهیدرات و ۰/۰۲۵٪ بروموکروزل پرپل به عنوان شاخص pH انجام شد. نتایج بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۰°C ثبت شد. برای تامین شرایط بی‌هوازی یک میلی لیتر پارافین مایع استریل بر سطح محیط قندی اضافه گردید. نتایج آزمون‌جدایه‌ها با خصوصیات بیوشیمیایی *انتروکوکوس*ها در کتاب راهنمای برگیس مطابقت داده شد (۱۸). یک نماینده از هر گروه باکتری که بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی طبقه بندی شدند جهت بررسی خواص تکنولوژیکی انتخاب شد.

شناسایی مولکولی *انتروکوکوس*های جداسازی شده از شیر شتر

جهت استخراج DNA کلنی خالص از هر جدایه در ۵۰ میکرولیتر آب استریل دیونایز تعلیق سازی شد و سپس ۵۰ میکرولیتر از الکل ایزوآمیل/کلروفرم (۲۴/۱) اضافه گردید و بعد از ورتکس کردن، مخلوط در g ۱۶۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس از فاز آبی بالا به عنوان یک منبع DNA برای واکنش PCR استفاده گردید (۱۴).

پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن 16S rRNA، B27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و U1492R (5′- ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3′) بودند.

واکنش PCR به وسیله مخلوط کردن ۵ µ از DNA استخراج شده با ۲۵ µ از 2X PCR (SinaClon, Iran) Master، ۱µl از پرایمر B27F و ۱ µl از پرایمر U1492R با غلظت ۱۰ picomole/µl و ۱۸ µl آب دیونایز استریل با شرایط زیر انجام گردید:

دناتوراسیون اولیه: ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه، سپس ۴۰ سیکل در ۹۴ °C (۱ دقیقه)، ۵۶ °C (۱ دقیقه) و ۷۲°C (۱ دقیقه). بعد از توسعه نهایی در ۷۲ °C (۱۰ دقیقه)، تیوب‌ها در ۴°C سرد شدند (۵). در نهایت آمپلیکون حاصل جهت توالی یابی به شرکت ماکروژن کره فرستاده شد و نتایج آن با داده‌های گزارش شده در NCBI مقایسه گردید.

ارزیابی کیفی فعالیت پروتئولیتیکی

فعالیت پروتئولیتیکی جدایه‌ها به وسیله تکنیک کشت بر روی پلت کانت آگار (مرک، آلمان)حاوی ۲٪ پودر شیراسکیم (مرک، آلمان)و بررسی هاله حاصل از پروتئولیز ایجاد شده توسط آن‌هاارزیابی شد. هر

جدایه‌با ایجاد هاله اطراف کلنی به عنوان باکتری با فعالیت مثبت پروتئولیتیکی ثبت شد(۴).

ارزیابی کیفی فعالیت لیپولیتیکی

محیط کشت زیر (بر اساس گرم در لیتر) جهت بررسی فعالیت لیپولیتیکی بررسی شد. پپتون ۱۰، کلرید کلسیم ۰/۱، کلرید سدیم ۵ و آگار ۲۰ (سیگما، آمریکا). سپس محیط با آب مقطر به حجم رسانده شد و برای ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. ۱۰ میلی لیتر توئین ۲۰ (سیگما، آمریکا) استریل شده به آن اضافه شد و تحت شرایط استریل pH آن تا ۶ تنظیم شد. از کشت تازه هر جدایه به میزان ۱۰٪ به محیط تلقیح شد و ۲۴ ساعت در ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شد. فعالیت لیپولیتیکی توسط ظهور رسوب قابل رویت حاصل از ترسیب کریستال-های نمک کلسیم تشکیل شده از اسید چرب آزاد شده به وسیله آنزیم یا به صورت ایجاد ناحیه شفاف رسوب اطراف کلنی به واسطه تجزیه کامل نمک اسید چرب نشان داده می‌شود (۴).

ارزیابی کمی فعالیت لیپولیتیکی

جدایه‌های انتروکوکوسی در M17 براث به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ °C کشت گردیدند. سپس کشت حاصل در ۸۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی به عنوان عصاره خام آنزیمیبرای ارزیابی کمی فعالیت لیپولیتیکی انتخاب گردید (۷).

فعالیت آنزیم لیپاز طبق روش یامادا و همکارانش (Yamada *et al*)به صورت زیر اندازه‌گیری شد:

یک میلی لیتر محلول آنزیمی به ۳ میلی لیتر بافر فسفات۰/۲ مولار با pH =۷ و ۱ میلی لیتر محلول کلرید کلسیم ۰/۱ مولار اضافه گردید. سپس ۵ میلی لیتر از امولسیون سوبسترا (روغن زیتون و پلی‌وینیل الکل با نسبت حجمی ۳/۱) به آن اضافه شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، برای خاتمه واکنش ۲۰ میلی لیتر مخلوط هم حجم استن- اتانول به آن اضافه گردید تا امولسیون شکسته گردد. سپس ۳ قطره فنل فتالئین ۱٪ به آن افزوده و با سود ۰/۰۵ نرمال تیتر گردید. حجم سود مصرفی جهت تیتر را V_1 فرض می‌کنیم. برای محلول شاهد، کلیه مراحل فوق به غیر از افزودن محلول آنزیمی انجام شد. حجم سود مصرفی در تیتراسیون شاهد را V_2 فرض کردیم.

واحد فعالیت لیپاز (LU)، مقدار فعالیت آنزیمی است که یک میکرومول اسید چرب را در مدت ۱ دقیقه در شرایط دمای ۳۷°C و بافر فسفات با pH=۷، از سوبسترا آزاد نماید. طبق فرمول زیر فعالیت آنزیم در هر میلی لیتر محاسبه گردید (۲۰).

$$U = \frac{N \times (V1 - V2) \times 1000}{t}$$

[Unit/ml] فعالیت =U؛ نرمالیته سود مصرفی جهت تیتراسیون= N؛ $V= V_1- V_2$؛ مدت زمان آزمایش= t.

ارزیابی قابلیت تولید اسید

سویه‌ها به طور اولیه در M17 براث فعال‌سازی شده و سپس به میزان ۱٪ در شیر اسکیم بازسازی شده به همراه عصاره مخمر ۰/۲٪ و گلوکز ۰/۱٪ کشت داده شدند و سپس در طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۰درجه سانتی‌گراد pH آن اندازه‌گیری گردید (۷).

ارزیابی قابلیت اتولیتیکی

پلت سلولی از کشت شبانه در بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار با pH=۵/۵ حاوی ۱ مولار کلرید سدیم تعلیق سازی شده و تا OD_{620} معادل ۱ رقیق سازی می-شود. سوسپانسیون سلولی در معرض یک سیکل انجماد (۲۰- درجه سانتی‌گراد، ۲۴ ساعت) و خروج از انجماد قرار گرفته سپس در ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری می‌شود. میزان فعالیت اتولیتیکی به صورت کاهش درصد جذب

در ۶۲۰ نانومتر بر اساس فرمول زیر اندازه گیری شد (۱۷و۹). شدت اتولیز به صورت زیر محاسبه می شود:

$$(A0 - At) \times ۱۰۰/A0$$

A0 =جذب اولیه At= جذب اندازه گیری شده بعد از t زمان گرمخانه گذاری شده

براساس این فرمول، *انتروکوکوس*ها از نظر اتولیز شدن براساس معیار تشریح شده توسط آیاد و همکارانش (*Ayad et al*) به صورت زیر درجه‌بندی می‌شوند: خوب=۳۵-۶۶، نسبتا خوب= ۲۴-۳۴ و ضعیف= ۰-۲۲ (۳).

نتایج

پانزده باکتری *انتروکوکوس* قابل رشد بر روی KAA از شیر شتر جداسازی گردید. جدول ۱ نشان می‌دهد که بیشترین تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر در دمای $۴۵\ ^0C$ حاصل می‌شود که نشان دهنده غالب بودن *انتروکوکوس*های ترموفیل در شیر شتر می‌باشد.آزمون‌های بیوشیمیایی و فنوتیپکی بر اساس مطابقت با راهنمای برگیس نشان دادند که این ۱۵ جدایه مربوط به ۶ گونه از ۳ گروه انتروکوکوسی می‌باشند. شکل ۱ ایجاد باند معادل ۱۵۰۰bp (با مقایسه با مارکر ۱۰۰۰bp) از تکثیر ژن 16S rRNA *انتروکوکوس*های جداشده از شیر شتر را نشان می‌دهد.

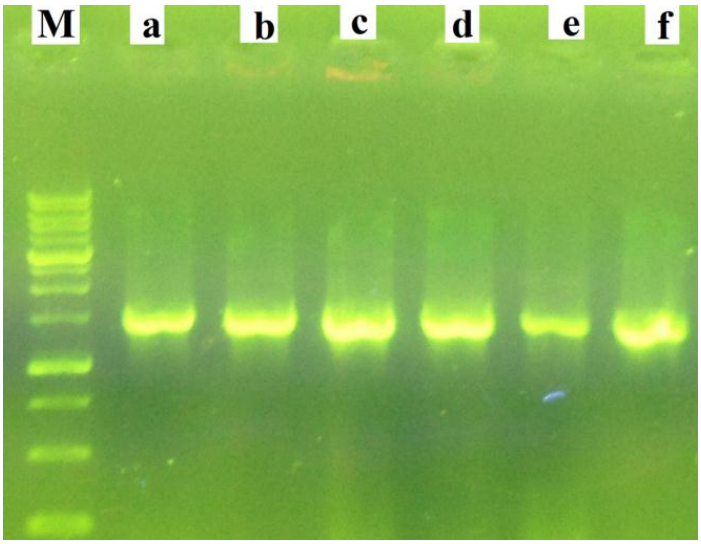
نتایج توالی‌یابی جدایه‌ها (خوانش دو طرفه) از شرکت ماکروژن کره در NCBI بلاست گردید. نمونه‌ها با میزان تطابق ۹۸-۹۹٪ در سطح گونه شناسایی شدند. نتایج شناسایی با هر دو روش فنوتیپکی، بیوشیمیایی و مولکولی یکسان بود. بر اساس شکل ۲ *انتروکوکوس فسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* به ترتیب بیشترین درصد اتولیز شدن را دارند. شکل ۳ نشان می‌دهد که بیشترین کاهش pH مربوط به سویه‌های *انتروکوکوس دورانس*، *انتروکوکوس موندتی*، *انتروکوکوس فسیوم* و *انتروکوکوس دوریس* می‌باشد. بر اساس جدول ۲ تمام جدایه‌ها از فعالیت لیپولیتیکی مناسبی برخوردار بوده و قادر به تولید لیپاز خارج سلولی هستند. و *انتروکوکوس فکالیس* با اختلاف کوچکی بیشترین فعالیت لیپولیتیکی را نسبت به سایر جدایه‌های انتروکوکوسی شیر شتر نشان داد. شکل ۵ رسوب قابل روئیتی از ترسیب کریستال‌های نمک کلسیم حاصل از اسید چرب آزاد شده توسط آنزیم لیپاز همه جدایه‌ها را نشان می‌دهد. بنابراین تمامی جدایه‌ها قادر به رشد بر روی محیط حاوی سوبسترای لیپیدی (توئین ۲۰) می‌باشند.کلیه *انتروکوکوس*های جدا شده از شیر شتردارای فعالیت پروتئولیتیکی قابل مشاهده‌ای که قادر به ایجاد هاله اطراف کلنی باشد نبودند (شکل ۶).

جدول۱- لگاریتم تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی انتروکوکوس‌ها در میلی‌لیتر

محیط کشت	دمای گرمخانه‌گذاری (°C)	لگاریتم تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی ($Log_{10}CFU/mL$)
KAA	۲۰	۵/۸۱۶ ±۰/۰۵
KAA	۳۷	۶/۳۹۷ ±۰/۰۲
KAA	٤٥	۸/۰۱۷±۰/۱۴

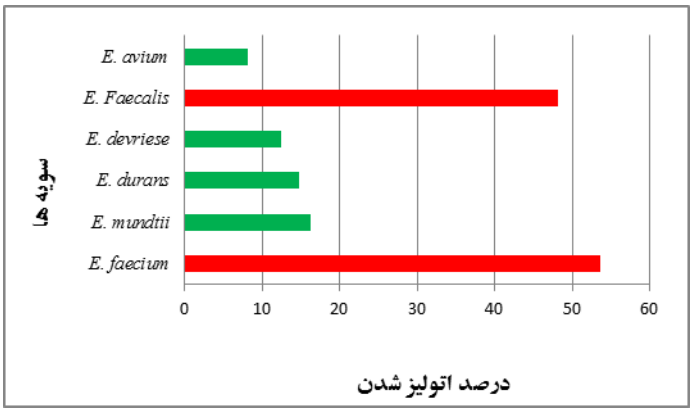
جدول۲- فعالیت لیپولیتیکی انتروکوکوس‌های جداسازی شده از شیر شتر

گونه باکتری	فعالیت لیپولیتیکی (Unit/ml)
E. durans	۸
E. devriese	۱۰/۵
E. mundtii	۱۰
E. faecium	۱۰
E. avium	۹/۶۵
E. faecalis	۱۱/۶۶



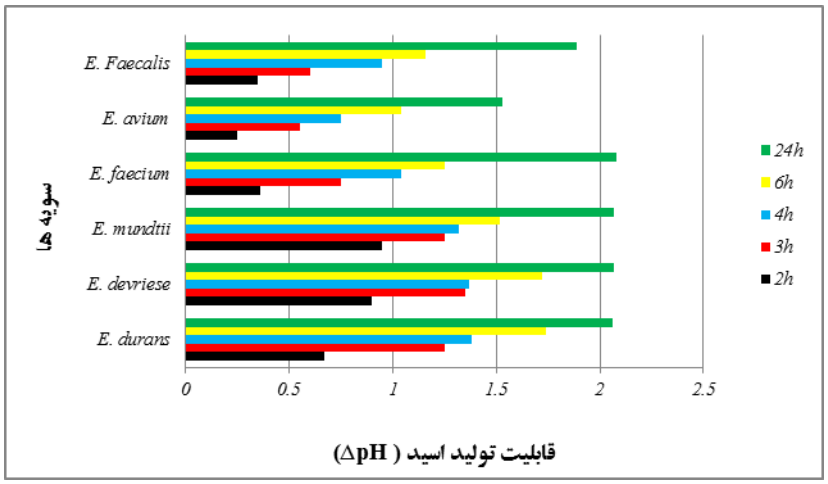
شکل۱- نتایج تکثیر ژن 16S rRNA با پرایمرهای یونیورسال B27F و U1492R انتروکوکوس‌های جدا شده از شیر شتر

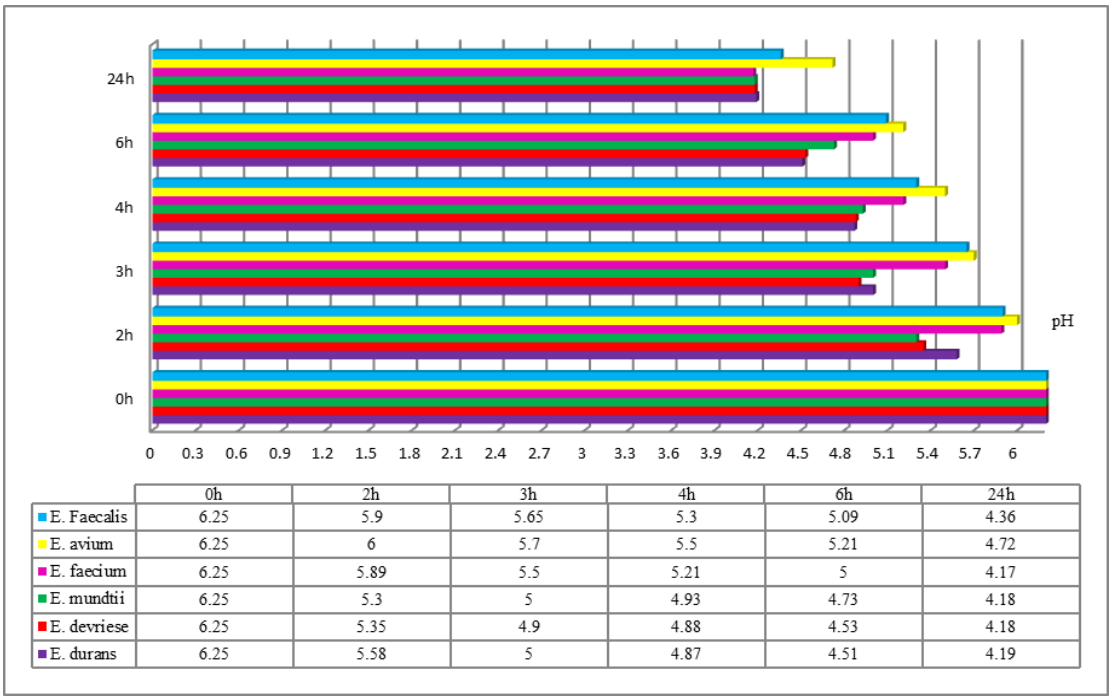
a: *E. faecium*, b: *E. mundtii*, c: *E. durans*, d: *E. devriese*, e: *E. faecalis*, f: *E. avium*, M: Ladder 1000bp



شکل ۲. درصد اتولیزاسیون انتروکوکوس‌های جداسازی شده از شیر برحسب کاهش واحد دانسیته نوری (OD 620nm)

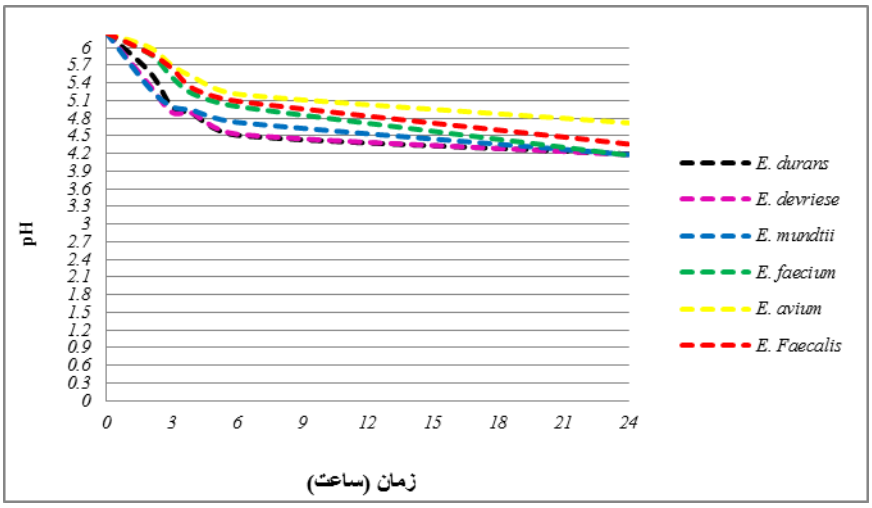
سبز: ضعیف قرمز: خوب



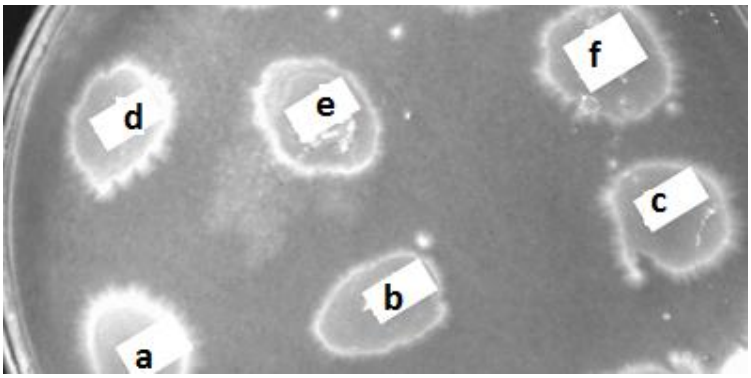


	0h	2h	3h	4h	6h	24h
E. Faecalis	6.25	5.9	5.65	5.3	5.09	4.36
E. avium	6.25	6	5.7	5.5	5.21	4.72
E. faecium	6.25	5.89	5.5	5.21	5	4.17
E. mundtii	6.25	5.3	5	4.93	4.73	4.18
E. devriese	6.25	5.35	4.9	4.88	4.53	4.18
E. durans	6.25	5.58	5	4.87	4.51	4.19

شکل - نمودار میله‌ای تغییرات pH انتروکوکوس‌های جداسازی شده از شیر شتر در طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری

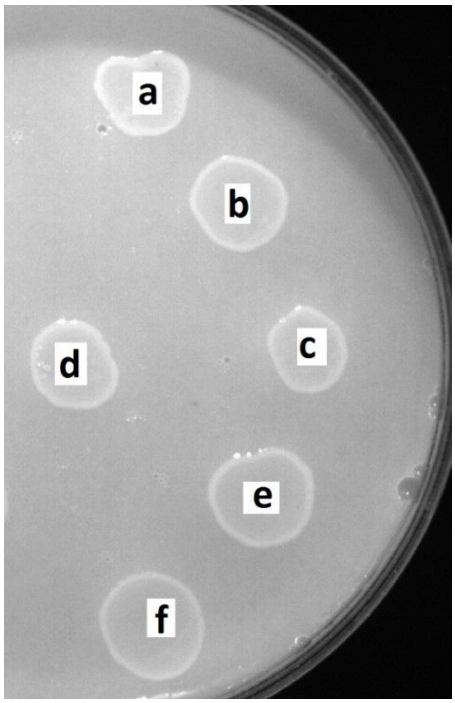


شکل - نمودار سرعت کاهش pH انتروکوکوس‌های جداسازی شده از شیر شتر در طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری



شکل- فعالیت لیپولیتیکی انتروکوکسی‌های جدا سازی شده از شیر شتر

a: *E. faecium*, b: *E. mundtii*, c: *E. durans*, d: *E. devriese*, e: *E. faecalis*, f: *E. avium*



شکل۶- عدم فعالیت پروتئولیتیکی قابل محسوس از انتروکوکسی‌های جدا شده از شیر شتر
a: E. faecium, b: E. mundtii, c: E. durans, d: E. devriese, e: E. faecalis, f: E. avium

بحث

نتایج این تحقیق حضور *انتروکوکوس دورانس*، *انتروکوکوس موندتی*، *انتروکوکوس فسیوم*، *انتروکوکوس دوریس*، *انتروکوکوس آویوم* و *انتروکوکوس فکالیس* را در شیر خام شتر تک کوهانه ایرانی استان گلستان نشان داد.حضور چنین انتروکوکوس‌هایی در شیر شتر در مطالعات گذشته نیز ثابت شده است. در مطالعه‌ای که بر روی جداسازی اسید لاکتیک باکتری‌های شیر خام شتر از ۳ نژاد ناجر، تارگوی و رگویبی گله‌های صحرایی در جنوب الجزایر انجام شد *انتروکوکوس دورانس*، *انتروکوکوس فکالیس* و*انتروکوکوس فسیوم*جداسازی گردید (۳). همچنین در مطالعه‌ای دیگر حضور *انتروکوکوس دورانس* و *انتروکوکوس فسیوم* در جداسازی اسید لاکتیک باکتری‌های موجود در شابوت (یک محصول تخمیری از شیر شتر در چین و مغولستان) نشان داده شد (۱۵).

مطابق شکل ۲، براساس معیار طبقه بندی و فرمولی که قبلا اشاره شد امتیاز میزان اتولیز شدن *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فسیوم* خوب می‌باشد (میزان اتولیز شدن: ۳۵-۶۶= خوب، ۲۴-۳۴ = نسبتا خوب و ۰-۲۲ = ضعیف).

محققین در مطالعه‌ای مشابه در الجزایر نشان دادند که *انتروکوکوس فسیوم* و *انتروکوکوس دورانس* جدا شده از شیر شتر دارای قدرت اتولیزاسیون خوبی می‌باشند. اختلاف در شدت اتولیزاسیون در بین سویه‌ها از تنوع وسیع آن‌ها حاصل می‌شود. توانایی سویه‌ها به لیز شدن و آزاد کردن آنزیم‌های درون سلولی در طی رسیدگی پنیر، ویژگی مطلوبی در صنعت محسوب می‌شود (۱۹).کشت‌هایی با شدت بالای اتولیزاسیون در تولید پنیر به دلیل رهایش سریع‌تر آنزیم‌های لیپولیتیکی و پروتئولیتیکی که در تشکیل طعم محصولات تخمیری لبنی می‌تواند موثر باشد از اهمیت بالایی برخوردار است. یکی از موثرترین راه‌های تسریع در رسیدگی پنیر

افزودن کشت‌های الحاقی می‌باشد که بهتر است برپایه پروفایل‌های آنزیمی و خصوصیات اتولیتیکی باشد.

نتایج تحقیقات گذشته نشان داده‌است که اگر باکتری‌های اسید لاکتیک بتوانند بعد از ۳ ساعت گرمخانه گذاری، ΔpH معادل ۰/۴ واحد حاصل کرده و همچنین بعد از گذشت ۶ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۰°C، pH معادل ۰/۲± ۵حاصل کنند به عنوان استارتر مناسب برای صنعت پیشنهاد می‌شوند و تولیدکننده ضعیف اسید به عنوان استارتر کمکی بسته به خواص مورد انتظار از تخمیر استفاده می‌شود (۱۱). باتوجه به شکل ۳ همگی انتروکوکسی‌های جداسازی شده از شیر شتر قادر به ایجادΔpH معادل۰/۴واحد بعد از ۳ ساعت بوده و بعد از گذشت ۶ ساعت از کشت قادر به ایجاد pH معادل۰/۲± ۵ می‌باشند. بنابراین این جدایه‌ها به عنوان استارتر قوی در صنعت می‌توانند پیشنهاد شوند. بر اساس شکل ۴*انتروکوکوس دورانس*، *انتروکوکوس موندتی* و *انتروکوکوس دوریس*در ۶ ساعت اولیه کشت از سرعت کاهشpH بالایی برخوردار بوده در حالیکه درمورد سایر جدایه‌ها این روند کاهش در طی ۲۴ ساعت تدریجی بوده و از شیب ملایم‌تری برخوردار می‌باشند. کاهش سریع pH درطی مراحل اولیه تخمیر پنیر اهمیت جدی برای کوآگولاسیون، کاهش و جلوگیری از رشد میکروفلور غیرذاتی و خارجی دارد. انتخاب سویه‌های تولیدکننده سریع اسید، برای فرایندهای تخمیری لبنی اصلی بسیار مهم است. کشت‌های الحاقی بسته به خصوصیات مهم دیگرشان نظیر فعالیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی نیز اضافه می‌شوند. بوتازی در سال ۱۹۶۲ (۱۰) و فونتینا در سال ۱۹۹۸ (۸) در مورد لاکتیک اسیدباکتری‌ها گزارش کردند "هیچ ارتباطی بین فعالیت پروتئولیتیکی و تولید اسید توسط لاکتوباسیل‌ها وجود ندارد". مشابه این یافته، در مورد جدایه‌هایی با توانایی بالای تولید اسید نظیر *انتروکوکوس*های موجود در شیر شتر در این مطالعه است که فعالیت پروتئولیتیکی (شکل ۶) نشان ندادند.

البته فعالیت پروتئولیتیکی و توانایی تولید اسید توسط *انتروکوکوس*ها در شیر گاهی با باکتری‌های مهمی نظیر *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* قابل مقایسه است (۹). فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک برای رشد باکتری‌ها در شیر و توسعه خصوصیات ارگانولپتیک محصولات شیر ضروری می‌باشد (۶و۲). تولید محصولات تخمیری با کیفیت بالا وابسته به سیستم پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی باکتری‌های استارتر می‌باشد زیرا اسیدهای چرب، پپتیدها و اسیدهای آمینه تشکیل شده اثر مهمی در تولید طعم و یا پیش‌سازهای طعم دارد. همه پپتیدازهای باکتری‌های اسید لاکتیک درون سلولی شناخته شده و در محصولات تخمیری لبنی بعد از لیز شدن سلول رها می‌شوند (۱۳). براساس مطالعه‌ای که جینی و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در مورد جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک از ماهی آب شیرین انجام دادند فعالیت لیپولیتیکی *انتروکوکوس فکالیس* جداسازی شده حدود ۱۲ واحد در هر میلی‌لیتر از عصاره کشت (عصاره خام آنزیمی) ارزیابی گردید که با نتیجه این مطالعه در ارتباط با *انتروکوکوس فکالیس* نزدیکی دارد (۱۲). با توجه به ارزیابی که بر روی برخی خواص مهم تکنولوژیکی *انتروکوکوس*های جداشده از شیر خام شتر تک کوهانه ایرانی انجام شد آشکار گردید که تمام این جدایه‌ها از فعالیت لیپولیتیکی و تولید اسید بالایی برخوردار بوده و دو سویه *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فسیوم* دارای خاصیت اتولیز شدن در حد نسبتا خوب می‌باشند. ولی توان پروتئولیزی محسوسی ندارند. البته باید مقاومت دارویی این جدایه-

ها بررسی شود. در صورت بی‌ضرر بودن این جدایه می‌توان آن‌ها را به عنوان استارترهای الحاقی در کنار سایر استارترهای اصلی محصولات لبنی پیشنهاد کرد.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد که‌در انجام این‌پروژه مساعدت نموده اند، تشکرنماییم.

References

1. Ahmed, T., Kanwal, R. (2004). Biochemical characteristics of lactic acid producing bacteria and preparation of camel milk cheese by using starter culture. *Pakistan Veterinary Journal* **24**: 87-91.
2. Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and FunctionalAspects*. 2nd Edition. Marcel Dekker, New York: 1-72.
3. Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, M., Metwaly, H., El-Soda, M. (2004). Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology***21**: 715-25.
4. Bettache, G., Fatma, A., Miloud, H., Mebrouk, K. (2012). Isolation and identification of lactic acid bacteria from Dhan, a traditional butter and their major technological traits. *World Applied Sciences Journal* **17**: 480-8.
5. Bulut, Ç. (2003). Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese*: İzmir Institute of Technology, İzmir.*
6. Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steelz, L.J. (1999). Peptidases and amino acid catabolismin lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**: 217-46.
7. Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. (2001). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from Beyas cheese made from raw ewe's milk. *Journal of Applied Microbiology* **91**: 861-70.
8. Fontina, M.G., Nicastro, G., Garminati, D., Neviani, E., Manachini, P.L. (1998). *Lactobacillus helviticus* heterogeneity in naturalcheese starters: the diversity inphenotypic characteristics. *Journal of Applied Microbiology* **84**: 72-80.
9. Gatti, M., Fornasari, E., Garni, D., Giraffa, G., Neviani, E. (1994). Glienterococchi nei formaggi italiani: attivita biochimiche e signifato technologica. *Industria del Latt* ,**30**: 11-27.
10. Hassaïne, O., Zadi-Karam, H., Karam, N.E. (2008). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from three breeds dromedary raw milk in south Algeria, *Emir. Journal of Food Agriculture* **20**: 46-59.
11. Huggins, A.R., Sandine, W.E. (1984). Differentiation of fast and slow milk coagulating isolates in strains of Streptococci. *Journal of DairySciences* **67**: 1674-9.
12. Jini, R., Swapna, H.C., Amit Kumar, R., Vrinda. R., Halami, P.M., Sachindra, N.M., Bhaskar, N. (2011). Isolation and characterization of potential lactic acid bacteria (LAB) from freshwater fish processing wastes for application in fermentative utilisation of fish processing waste. *Brazilian Journal of Microbiology* **42**: 1516-25.
13. Law, J., Haandrikman, A. (1997). Proteolytic enzymes of lactic acidbacteria. *Dairy Journal* **7**: 1-11.
14. Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R. (2005). Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR Applications. *Analytical Biochemistry* **347**: 333-5.
15. Serikbayeva, A., Konuspayeva, G., Faye, B., Loiseau, G., Narmuratova, M. (2005). Probiotic properties of a sour-milk product : shubat from the camel milk. Desertification combat and food safety : the added value of camel producers. Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop, 19-21 April 2004, Ashgabad, Turkmenistan. pp: 187-91.
16. Sweet, L.E. (1965). Camel raiding of North Arabian Bedouin: A mechanism of ecological adaptation. *American Anthropologist* **67**: 1132-50.
17. Thiboutot, H., Dako, E., ElSoda, M., Vuillemard, J.C., Power, N., Simard, R.E. (1995). Influence of heat and freeze shocking on the autolysis andpeptidase activities of *Lactobacillus casei. Milk Science International* **50**: 448-52.

18. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Edition. Vol. 3, Springer Dordrecht Heidelberg, New York: 598-9.
19. Wilkinson, M.G., Guinee, T.P., Callaghan, D.M.O., Fox, P.F. (1994). Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during cheese ripening. *Journal of Dairy Research* **61**: 249-62.
20. Yamada, K., Ota, U., Machinda, H. (1962). Studies on the production oflipase by microorganisms. Quantitative determination of lipase. *Agricultural and Biological Chemistry* **26**: 63-9.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 11, Issue 2, 2015

Isolation and Identification of *Enterococcus* species from Raw Milk of Iranian One Humped Camel (*Camelus dromedarius*) and Evaluation of Their Technological Properties

Davati, N.[1], Tabatabaee yazdi, F.[2], Zibaee, S.[3]*, Shahidi, F.[4], Edalatian, M.R.[5]

1. PhD Student of Food Microbiology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Science Industry. Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Assistant Professor, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Mashhad, Iran
4. Professor, Department of Food Science Industry, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
5. Assistant professor, Department of Food Science Industry. Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received Date: 6 April 2014 Accepted Date: 21 June 2014

Abstract: *The aim of this study is identification of Enterococcal species from raw milk of Iranian one humped camel (Camelus dromedarius) and evaluation of their technological properties. A total of 15 Enterococcus were isolated from camel milk of Golestan province in Iran. The* $\log_{10}$ CFU *of* Enterococci *per milliliter on* KAA medium *under anaerobic condition at 20, 37 and 45* ***°C****included 5/816±0/05, 6.397±0/02 and 8/017±0/14 respectively. Therefore, the most of Enterococcal species in camel milk is thermophilic Enterococcus. Isolates were identified on the basis of biochemical and phenotypic characters as E. durans, E. mundtii, E. faecium, E. devriesei, E. avium, E. faecalis. This identification was confirmed by molecular method (amplification16S rRNA gene using* B27F-U1492R *universal bacterial* primer *and sequencing of PCR product). These isolated bacteria have lipolitycy activity and high acidifying activity. Enterococcus faecalis showed more lipolytic activity than other isolates. Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis showed the highest autolytic activity. Based on technological properties of isolates, Enterococcus bacteria from camel milk are suggested as good candidates for camels milk processing or other dairy fermentation process.*

Keywords*: Camel, Enterococcus, Lipolytic, Autolytic, Proteolytic*

**Corresponding author: Zibaee, S.*
Address: Assistant Professor, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Mashhad, Iran. Tel: +989153045919
Email: zibaee@mrazi.ac.ir