شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از سرکه سیب

صابره نوری[۱]، سنبل ناظری[۱*] و پرهام حسینی[۲]

[۱] **همدان، دانشگاه بوعلی سینا، گروه بیوتکنولوژی**

[۲] **اصفهان ، دانشگاه صنعتی اصفهان، گروه گیاه پزشکی**

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۹

چکیده

پروبیوتیکها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند، که مصرف آنها در بدن میزبان باعث تقویت و تعادل در فلور میکروبی روده می شود و اثرات مفیدی را در سلامتی میزبان به همراه دارد. *لاکتوباسیلوس*ها از فراوان‌ترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک هستند، که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* یکی از باکتریهای شاخص این گروه است. به نظر می‌رسد مصرف فرآورده‌های غذایی حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، سبب کاهش عفونت دستگاه گوارش و خطر بیماری التهاب روده‌ای و اثر تحریک کننده سیستم ایمنی گردد. هدف از این تحقیق بررسی امکان حضور *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در سرکه سیب است. میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه‌های سرکه سیب جداسازی و برخی ویژگیهای بیوشیمیایی آنها از قبیل تخمیر قندها و عمل آنزیمهای کاتالاز و اکسیداز خارج سلولی بررسی شدند. شناسایی مولکولی سویه‌ها توسط آغازگر اختصاصی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* انجام شد. خواص پروبیوتیکی این باکتریها از جمله توانایی رشد در pH و غلظتهای صفراوی مختلف بررسی گردید. از بین هشت میکروارگانیسم استخراج شده از سرکه‌های سیب، سه جدایه با پرایمرهای اختصاصی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، باند اختصاصی تشکیل دادند. این باکتریها گرم مثبت و کاتالاز و اکسیداز منفی بودند. این سویه‌ها به خوبی در محیطهای اسیدی و صفراوی رشد کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که سرکه سیب می‌تواند منبع مناسبی برای جداسازی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* باشد.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، سرکه سیب

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱-۳۴۴۲۴۳۶۶ ، پست الکترونیکی: snazeri@basu.ac.ir

مقدمه

پروبیوتیکها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در مقادیر مناسب، تأثیری مثبت بر سلامت میزبان می‌گذارند (۹). این باکتریها می‌توانند در شرایط pH پایین دستگاه گوارش زنده مانده و با نابودی میکروارگانیسم‌های مضر داخل روده و همچنین تعادل فلور میکروبی روده، موجب حفظ سلامتی و افزایش میزان رشد در انسان و دام گردند. از عملکردهای این باکتریها می‌توان به فعالیت ضد میکروبی، بهبود سوخت و ساز بدن، کاهش کلسترول در سرم خون، تحریک سیستم ایمنی بدن، خواص آنتی موتاژن، خواص ضد سرطان، خواص ضد اسهال، بهبود بیماریهای التهاب روده و سرکوب هلیکوباکترها اشاره کرد (۱۵). در سیستم‌های گیاهی نیز این باکتریها مؤثر هستند. بیشترین سود باکتریهای پروبیوتیک برای گیاه، اثر بر باروری خاک است و همچنین این میکروارگانیسم‌ها به صورت تجاری برای کنترل بیولوژی بیماری گیاهی مورد استفاده قرارمی‌گیرند (۱۶). توانایی این باکتریها درانحلال فسفر نامحلول در خاک و آماده سازی آن برای استفاده توسط گیاه نیز به اثبات رسیده است (۱۲).

پروبیوتیکها برای قرنها در محصولات لبنی تخمیر شده استفاده می‌گردند. در سالهای اخیر علاقه به کاربردهای غذایی و کشاورزی پروبیوتیک افزایش یافته، انتخاب سویه‌های پروبیوتیک جدید و توسعه کاربردهای نوین اهمیت زیادی پیدا کرده است. هرچند محصولات لبنی اولین منابع مواد غذایی پروبیوتیک شناخته شده هستند (۱۶)، در دهه‌های اخیر مطالعات نشان داده است که باکتریهای پروبیوتیک در منابع غیر لبنی نیز یافت می شوند(۱۷). به دلیل رژیمهای غذایی ویژه، از جمله گیاه خواری (عدم استفاده از ترکیبات گوشتی) و مشکلات حاصل از کلسترول بالای شیر و عدم تحمل لاکتوز در بعضی از افراد، تقاضا برای محصولات پروبیوتیک غیرلبنی افزایش یافته و سبب شده که توسعه محصولات پروبیوتیک با پایه گیاهی اولویتی برای تحقیقات کلیدی باشد (۱۶).

واژه سرکه یا vinegar یک کلمه فرانسوی به معنی شراب ترش است که از واژه‌های وین (vin) به معنی شراب و اگار (egar) به معنی ترش مشتق شده است، که به روشهای مختلف و با استفاده از مواد اولیه متفاوتی تهیه می‌شود. سرکه از تخمیر الکلی و به دنبال آن تخمیر استیکی مواد قند دار به وجود می‌آید. سرکه سیب یکی از فرآورده‌های سیب است که به عنوان یک نگه دارنده و طعم دهنده در صنایع غذایی کاربرد دارد (۱۵). سرکه سیب حاوی اسید های آلی مانند اسید مالیک و اسید استیک و فلاونوییدها مانند کامپرول، اپی کاتچین، کاتچین، آنتوسیانین، کوئرستین است، مطالعات نشان داده است که می تواند برای جلوگیری از افزایش فشار خون مؤثر بوده و مواد سمی وارد شده به بدن را خنثی کند. سرکه سیب دارای بتاکاروتن است، که خاصیت ضد رادیکالی و آنتی اکسیدانی دارد، و می‌تواند برای درمان دیابت، کاهش وزن، کلسترول بالای خون و سنگ صفرا مورد استفاده قرار می-گیرد (۱۱). پژوهشهای انجام شده بر روی سرکه سیب در ایران تأثیر مصرف آن بر کاهش خطر انعقاد خون، پیشرفت آترواسکلروز و چربی خون نشان داده شده است (۳ و ۵).

*لاکتوباسیلوس*ها باکتریهای میله‌ای گرم مثبت، کاتالاز و اکسیداز منفی هستند (۱۸). حضور این میکروارگانیسم در فلور میکروبی تعداد زیادی از فرآورده‌های تخمیری گیاهی و لبنی و گوشتی نشان داده شده است. حضور این باکتری به عنوان یک باکتری پروبیوتیک در دستگاه گوارش نیز بیان شده است. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* یکی از گسترده-ترین و مهم‌ترین گونه از گستره باکتریهای اسید لاکتیک است، که این ویژگی به دلیل توانایی بالای آن در سازگاری و انطباق با نیچ‌های متفاوت است. از اثرات سلامتی اثبات شده مصرف فرآورده های غذایی حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، می‌توان کاهش عفونت دستگاه گوارش و خطر بیماری التهاب روده‌ای و اثرات تحریک کننده سیستم ایمنی اشاره کرد. مطالعات نشان داده که باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان بازدارنده طبیعی در غذاهای فرآوری شده زیستی، از رشد باکتریهای بیماری‌زا و میکروارگانیسم‌های عامل فساد در طول انبارداری ممانعت کرده و طول عمر نگهداری محصول را افزایش می‌دهد (۴).

پروتئین Rec A در سلولهای پروکاریوت، پروتئینی فعال است که وظایف چند گانه‌ای را در سلول باکتری ایفاء می-کند. ژن کد کننده این پروتئین ابتدا در باکتری *اشریشیا کلی* شناخته شد و تلاش برای یافتن معادل این ژن در باکتریهای لاکتیک منجر به شناسایی انواع زیادی از این پروتئین شده است. پروتئین Rec A (Recombinase A)، پروتئینی کوچک است که عملکردهای مختلف آن در اتصال DNA (تک رشته و دو رشته)، جفت شدن و تبادل هومولوگ DNA و هیدرولیز ATP به اثبات رسیده است (۲۰). این پرایمر در بررسی گونه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس* به ویژه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* استفاده و مورد تأیید قرار گرفته است(۲۱).

هدف از این تحقیق بررسی امکان حضور *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در سرکه سیب، با استفاده از روشهای

بیوشیمیایی، مولکولی و ویژگیهای پروبیوتیکی این میکروارگانیسم است.

مواد و روشها

جمع‌آوری و آماده سازی نمونه‌ها: سه نمونه سرکه سیب خانگی (چند ساله) از منابع محلی اصفهان (که تا روز نمونه برداری در دمای محیط، در استان اصفهان نگهداری می‌شده‌اند) جمع‌آوری و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه بوعلی سینای همدان انتقال داده شدند. نمونه‌ها در رقتهای صفرتا 10^{-4} در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شدند.

کشت و گرمخانه گذاری نمونه‌ها: ۱۰۰ میکرولیتر از رقتهای مختلف تهیه شده از نمونه‌ها بر روی محیط کشت اختصاصی (MRS)، برای رشد باکتریهای پروبیوتیک به-ویژه *لاکتوباسیلوس‌ها*، کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه نگهداری شدند (۸).

بررسی خصوصیات مورفولوژی: خصوصیات ظاهری هر کلنی و خصوصیات ظاهری سلول، پس از رنگ آمیزی گرم توسط میکروسکوپ نوری بررسی و ثبت شد. از کلنیهای مشابه *لاکتوباسیلوس*، با ویژگی باکتریایی میله‌ای شکل، گرم مثبت و بدون اسپور، جهت انجام آزمون کاتالاز و تأیید جنس *لاکتوباسیلوس* نمونه برداری شد. برای تأیید خلوص باکتری، هر سویه چند بار در محیط MRS واکشت شد (۱۰).

تخمیر کربوهیدرات‌ها: تولید اسید از قندها با به کارگیری محیط MRS بدون عصاره گوشت و گلوکز انجام شد. بدین منظور در هر لوله آزمایش (دارای لوله دورهام)، دو میلی لیتر محیط MRS مایع مخصوص تخمیر (حاوی یک درصد قند مورد نظر) و معرف فنل رد (قرمز) اضافه شد. پس از تلقیح یک درصد از کشت فعال جدایه باکتری مورد شناسایی، لوله‌ها در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی گراد، تحت شرایط پنج درصد گاز دی اکسید کربن، به مدت ۷۲ ساعت تا یک هفته نگهداری شدند. تبدیل رنگ قرمز محیط به رنگ زرد و تشکیل حباب در لوله های دور به معنی مصرف قند و تولید اسید تلقی گردید (۱۳).

ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی: توانایی رشد باکتریها در محیطهای MRS با pH معادل ۳/۵، ۴، ۴/۵ و ۵ آزمایش شد. در همه موارد، جهت کاهش pH، از اسید کلریدریک ۸ نرمال استفاده شد. همزمان، توانایی باکتریها برای رشد در محیط MRS حاوی ۰/۳ و ۰/۵ درصد اکس‌گال ارزیابی شد. برای انجام این آزمایشها، ابتدا کشت فعال از هر ذخیره باکتریایی تهیه و به نسبت یک درصد به محیط کشت مایع مورد آزمایش اضافه شد. محیطهای کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شدند. توانایی رشد جدایه‌های مورد مطالعه در محیطهای فوق با مشاهده تغییرات کدورت (به شکل چشمی) و پس از ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت ونتایج به شکل مثبت یا منفی درج گردید (۱۹).

شناسایی مولکولی: ابتدا DNA باکتریها به روش موری و تامسون با اندکی تغییرات خالص شد (۱۴). در این روش، ۱۰ میلی لیتر سوپانسیون باکتری (از کشت ۲۴ ساعته) با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوبها به درون میکروتیوب انتقال داده شد و روی آنها یک میلی لیتر بافر لیز کننده CTAB (پودر CTAB، محلول یک مولار Tris-Hcl (pH برابر ۸)، محلول نیم مولار Na_2EDTA (pH برابر ۸) و NaCl پنج مولار) با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد ریخته شد. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در حمام آب گرم در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و طی این مدت هر ۵ دقیقه به هم زده شد. هم حجم نمونه‌ها، کلروفرم ایزوآمیل الکل (۲۴ : ۱) افزوده شد و نمونه به شدت مخلوط گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت و هر چند دقیقه یک‌بار ویالها به شدت تکان داده شد. سپس نمونه‌ها به

مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله سه فاز تشکیل شد، که مایع بالایی هر کدام توسط سمپلر استریل به آرامی به ویالهای جدید انتقال داده شد و به میزان هم حجم آنها ایزوپروپانول سرد خالص به آن اضافه گردید. محتویات هر ویال به آرامی و با وارونه کردن ویالها کاملاً مخلوط شد و ویالها به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. برای ته نشین شدن DNA، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. مایع بالایی به آرامی خارج شده و به رسوب DNA، ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با شدت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و فاز رویی به آرامی از ویال خارج گردید. سپس ویالها به مدت یک ساعت در معرض هوا قرار گرفتند تا DNA خشک شود. بعد از اطمینان از خشک شدن رسوب، به هر میکروتیوب، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل دیونیزه اضافه شد و نمونه‌ها ابتدا به مدت یک شب در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای نگهداری طولانی مدت، نمونه‌ها به فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز یک درصد و بررسی جذب نوری تأیید شد(۱۴).

PCR: هر مخلوط واکنش PCR، با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، دارای ۷ میکرولیتر نمونه DNA بود. برای شناسایی ایزوله‌هایی که براساس خصوصیات فنوتیپی، به عنوان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شناسایی شده بودند، از یک آغازگر اختصاصی (plantF)؛ پیش برنده، و یک آغازگر عمومی(pREV)؛ معکوس، برای جنس *لاکتوباسیلوس* استفاده شد، آغازگرها از شرکت سیناژن خریداری شدند. آغازگر اختصاصی مورد استفاده، براساس توالی خاصی از ژن rec A، برای شناسایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، طراحی شده توسط توریانی و همکاران استفاده گردید (۲۰).

غلظت نهایی آغازگر در هر مخلوط واکنش PCR معادل یک میلی مولار بود. بدین منظور، به هر مخلوط واکنش، ۰/۵ میکرولیتر از محلول آغازگر اضافه شد. سپس از مستر میکس (Amplicon، دانمارک)، شامل مخلوط نوکلئوتیدی dNTP، MgCl2، آنزیم Taq پلیمراز و بافر، استفاده شد. برنامه مورد استفاده PCR (دستگاه Techne، انگلیس) به صورت: دناتوره شدن در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه و بعد از آن واکنش تکثیری مرحله اول در ۳۰ سیکل: دناتوره شدن در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۱ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه تنظیم شد. سپس برای مشاهده محصولات PCR، پنج میکرولیتر از محصول در چاهکهای ژل آگارز یک درصد در بافر TBE دارای مشاهده‌گر سبز با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز شد. پس از گذشت ۱/۵ ساعت، جریان برق قطع شد و از ژل در دستگاه ژل داک توسط اشعه ماورای بنفش عکس‌برداری شد.

بررسی مقاومت جدایه‌ها به تغییرات دما و نمک: توانایی رشد جدایه های *لاکتوباسیلوس‌ها* در دماهای ۱۵، ۲۰، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی گراد و در غلظتهای نمک ۴/۵ درصد و ۶/۵ درصد بررسی شد. همچنین توانایی این میکروارگانیسم‌ها برای احیای نیترات دنبال شد. تمامی این آزمونها به روش هاریگان و همکاران انجام شد (۱۰).

نتایج

میکروارگانیسم‌های متنوع، شامل: کوکسیهای گرم مثبت، باسیلهای میله‌ایی گرم مثبت و گرم منفی، و مخمرها، بر روی محیط کشت رشد کردند (جدول ۱). باکتریهایی که در زیر میکروسکوپ شکل باسیل داشته و در آزمایشات گرم پاسخ مثبت و در آزمونهای کاتالاز، اکسیداز و احیای نیترات پاسخ منفی داشتند، به عنوان لاکتوباسیلوس برگزیده

شدند. این باکتریها در ادامه آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۱- میکروارگانیسم‌های رشد کرده بر روی محیط کشت اختصاصی از سرکه سیب

سویه	شکل سلول	گرم
A1	باسیل	مثبت
A2	مخمر	-
A3	کوکسی	مثبت
B1	کوکوباسیل	منفی
B2	باسیل	مثبت
B3	مخمر	-
CW	باسیل	مثبت
CY	باسیل	مثبت

تخمیر قندها توسط این باکتریها در جدول۲ نشان داده شده است. الگوی تخمیر قندی سه جدایه (CY، B2 و A1) با مشخصه گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، ذکر شده در طبقه بندی سیستماتیک برجی (۱۹۸۶)، مطابقت داشت. این سه جدایه انتخاب و با پرایمرهای اختصاصی ژن *recA* بررسی گردیدند. با توجه به تشکیل باند مشخص در محدوده ۳۱۸bp در الکتروفورز محصولات PCR، به نظر می رسد که این سه جدایه به گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تعلق داشته باشند. شکل۱، تشکیل باندی در محدوده ۳۱۸ bp، مطابق با نتایج توریانی و همکاران در سال ۲۰۰۱، را نشان می‌دهد (۲۰).

جدول ۲- استفاده و تخمیر قند های مختلف. +رشد، -؛ عدم رشد، w؛ رشد ضعیف.

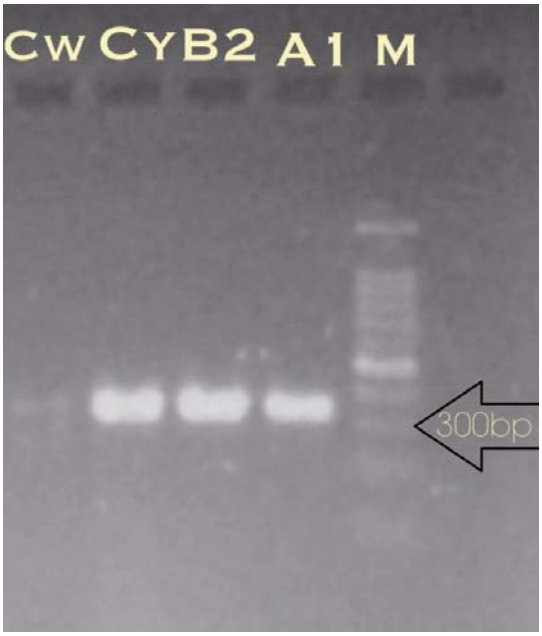
سویه	آرابینوز	سلوبیوز	فروکتوز	گالاکتوز	گلوکونات	لاکتوز	مانوز	مانیتول	ملیبوز	سوربیتول	رافینوز	ترهالوز	ریبوز	زایلوز
A1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	-
B2	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CW	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
CY	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

بررسی توانایی رشد، نشان داد که این باکتریها (از جمله سه جدایه احتمالی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*) در دماهای ۲۰ و ۴۰ درجه (در همان ۲۴ ساعت اولیه گرمخانه گذاری) به خوبی رشد کردند (جدول ۳). کدورت حاصل از رشد در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد بعد از ۴۸ ساعت قابل رؤیت بود، ولی باکتریها در دمای ۴۵ درجه رشد ضعیفی داشتند. در غلظتهای ۴/۵ درصد و ۶/۵ درصد نمک رشد باکتریها مشاهده شد. در غلظت ۴/۵ درصد کدورت بسیار زیاد و مشابه با نمونه‌های شاهد بود. باکتریها در غلظت ۶/۵ درصد نمک در نمونه‌های CY و B2 به خوبی رشد کردند ، هرچند نمونه A1 رشد ضعیفی در این غلظت نمکی از خود نشان داد. همه *لاکتوباسیلوس*های در غلظت ۰/۳ درصد اکس‌گال رشد خوبی داشتند. جدایه‌های B2 و CY رشد کمی در غلظت ۰/۵ درصد اکس‌گال نشان دادند (جدول۳). باکتریها رشد خوبی در pHهای مختلف به نمایش گذاشته، و حتی در pH ۳ نیز توانایی بقاء و رشد داشتند(یافته‌ها پس از گذشت ۲۴ تا ۷۲ ساعت مشاهده و ثبت گردیدند) (جدول۳).

جدول ۳- رشد *لاکتوباسیلوس‌ها* در دما، غلظتهای نمک، اکس‌گال و pH های متفاوت.

سویه ها	رشد در ۱۵درجه	رشد در ۲۰ درجه	رشد در ۴۰ درجه	رشد در pH ۲	رشد در pH ۳/۵	رشد در pH ۹/۶	رشد در اکس- گال ۰/۳درصد	رشد در اکس- گال ۰/۵ درصد	رشد در نمک ۴/۵درصد	رشد در نمک ۶/۵درصد
A1	+	+	+	-	+	-	+	-	+	W
B2	+	+	+	-	+	-	+	w	+	+
CW	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
CY	+	+	+	-	+	-	+	W	+	+

+رشد ، - ؛ عدم رشد، w؛ رشد ضعیف.



شکل ۱- تشکیل باند ۳۱۸ bp در الکتروفورز محصولات PCR *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*. لاینهای A1،B2،CY و CW ؛ایزوله های باکتری، M؛ مارکر100bp.

بحث و نتیجه گیری

سالانه هزاران تن از سیبهای درجه یک و دو در صنعت کشاورزی به صورت ضایعات از بازار خارج می‌شوند که این دور ریزها می‌توانند در صنعت سرکه‌سازی کاربرد فراوانی داشته باشد. شناسایی باکتریهای مولد اسید لاکتیک درگیر از منابع مختلف می تواند نقش مهمی در پیشرفت تحقیقات در بخشهای مختلف از جمله پزشکی، صنایع غذایی و کشاورزی داشته باشد. که در زمینه پزشکی تحقیقات محمودی اصل زاده و همکاران (۱۳۹۲) اثر پروبیوتیکی یکی از گونه های باکتریهای لاکتیک اسید بر روی سلولهای سرطانی نشان داده شد (۶).

طبق تحقیقات، توانایی بالا در متابولیزه کردن بسیاری از قندها در گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* باعث شده است تا گسترده‌ترین دامنه زیستگاهی را در میان گونه‌های *لاکتوباسیلوس* داشته باشد (۴). آزمایشهای بیوشیمیایی اولیه حضور سه جدایه با ویژگی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* که توانای تخمیر اکثر قندهای مورد استفاده را داشتند، در نمونه سرکه سیب نشان داد. تحقیقات نشان داده‌اند که وقتی سوشهای *لاکتوباسیلوس* (در گونه‌های بسیار نزدیک به هم) توالی نوکلئوتیدی ژن ۱۶SrRNA مشابهی دارند، ژنهای کد کننده پروتئینهای اختصاصی مانند RecA یا Hsp60 تفاوتهای لازم برای جدا کردن آنها را فراهم می‌کند (۲۰). در مطالعات تکمیلی مولکولی با استفاده از پرایمر اختصاصی recA حضور باند اختصاصی برای این گونه در سه جدایه مشاهده گردید. این نتایج به همراه نتایج بیوشیمیایی نشان داد که احتمالاً سه سویه استخراج شده A1, B2, CY *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* هستند. تاکنون این باکتری در ایران فقط از لبنیات استخراج شده و گزارشاتی از استخراج این گونه از زیتون تخمیری و شیر مادر نیز در دسترس است(۱و۴).

مطالعات نشان داده است که در میان گونه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان عادت پذیرترین گونه شناخته شده است. ژنوم بزرگ و توانایی آنزیمی قوی باعث شده است تا در میان گونه‌های *لاکتوباسیلوس*، این باکتری در منابع زیستی متفاوت با شرایط زیستی مختلف حضور داشته باشد (۷). در تحقیق د-وریس وهمکاران (۲۰۰۶)، *لاکتوباسیلوس‌های* مقاوم ازمنابع لبنی استخراج شدند. تحمل این باکتریها به شرایط اسیدی بررسی گردید، و باکتریهای فوق نتوانستند در pHکمتر از ۴ رشد کنند. در مطالعه حاضر احتمالاً به دلیل اسیدی بودن محیط زیست اولیه باکتری (محیط سرکه)، باکتریهای جدا شده تا اسیدیته ۳ نیز رشدی نزدیک به نمونه‌های شاهد را نشان دادند. در این رابطه نتایج حاصل با نتایج تحقیقات ساجدی نژاد و همکاران (۱۳۹۴) در مورد باکتریهای لاکتوباسیلوس استخراج شده از دهان مطابقت داشت (۲). در تحقیقات دیگر توانایی لاکتوباسیلوس ها در غلظتهای نمکی نشان داده شده است. در مطالعه ای که د-وریس وهمکاران (۲۰۰۶) بر رشد لاکتوباسیلوس ها در غلظتهای نمکی انجام دادند، باکتریهای مورد تحقیق اکثراً در غلظت نمک ۵ درصد به

بالا، رشد ضعیفی داشته و درصد بقاء به شکل قابل توجهی در غلظتهای بالای نمک کاهش یافت(۷). در تحقیق حاضر باکتریهای مورد مطالعه در غلظت ۴/۵ درصد به خوبی رشد کرده و ایزوله B2 رشد قابل توجهی (برابر با شاهد) در غلظت ۶/۵ درصد نمک را نشان داد. باکتریهای جدا شده در این تحقیق مقاومت خوبی در محیط حاوی صفرا از خود نشان دادند. مجموعه این آزمایشات نشان داد که لاکتوباسیلوس های جدا شده از سرکه سیب، احتمالاً توانایی بقاء در محیط معده و روده را دارند. هرچند مقایسه و تطابق کامل، نتایج مقاومت به اسید و صفرا بدست آمده در مطالعات مختلف، و با شرایط طبیعی بدن به سختی امکان پذیر است. اختلافات مشاهده شده می تواند به نوع سویه‌های مورد آزمایش، و تفاوت در شرایط آزمایش (از نظر محیط کشت و مواد مورد استفاده) و سیستم گوارش میزبان مرتبط باشد (۱۹). توانایی رشد لاکتوباسیلوس های حاضر در دامنه دمایی مختلف از ۱۵ تا ۴۵ درجه سانتی-گراد، می تواند نشان دهنده توانایی زنده‌مانی این باکتریها در سرکه سیب (در فصول مختلف) و در شرایط دمایی بدن (حتی در هنگام تب) باشد.

منابع

۱- اسمائیلی، ط.، امامی، ز.، احدی، ع.، شاهانی پور، ک. و شفیعی، م. ۱۳۹۱. شناسایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از زیتون با استفاده از روش PCR-RFPF. مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی. ۴(۱۲):۲۱-۲۸.

۲- ساجدی نژاد، ن.، شرفی، ح.، پاک نژاد، م.، سلیمانی شایسته، ی.، هوشمند، ب.، مدیری، س.، شهبازی ظهیری، ح.، اکبری نوقایی، ک. ۱۳۹۴. بررسی خاصیت ضد باکتریایی و پروبیوتیکی یک سویه لاکتوباسیلوس سالیواریوس NK02، جدا شده از دهان بر روی *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*، باکتری شایع در بیماران با التهاب لثه. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی. ۱(۲۸): ۷۶-۸۴.

۳- سترگی، م.، عسگری، ص. و محزونی، پ. ۱۳۸۸. کاهش عوامل خطر انعقادی، اکسیداتیو، آپولیپوپروتئین و پیشرفت آترواسکلروز در خرگوش‌های هایپرکلسترولمیک. فصلنامه ی دانش و تندرستی. ۴(۳): ۳۵-۴۰.

۴- طباطبایی، ف. و نصیرایی، ل. ۱۳۹۰. جداسازی و شناسایی باکتریهای خانواده اسید لاکتیک فلور میکروبی شیر مادر به روش سکوئنس DNA در ناحیه ۱۶S ریبوزومی. نشریه پژوهشهای صنایع غذایی.۲۱(۲): ۱۶۷-۱۷۷.

۵- عبدی، الف.، عبدی، ر.، ایروانی، الف. و روزبهانی، م. ۱۳۹۲. تأثیر هشت هفته تمرینات تناوبی به همراه خوردن سرکه سیب بر نیمرخ هماتولوژیک و چربی‌های خون در مردان جوان غیر ورزشکار. فصلنامه ی پزشکی ورزشی و آمادگی جسمانی. دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان، واحد خوراسگان. ۷۳-۸۴.

۶- محمودی اصل زاده، ح.، فاضلی، م.ر.، عیدی، الف.، صمدی، ن.، جمالی فر، ح.، پارساسرشت، ل. ۱۳۹۲. بررسی اثر پروبیوتیکی *Bifidobacterium bifidum* بر روی رده سلولهای سرطانی CacoII. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی. ۳(۲۶): ۳۷۸-۳۸۵.

7- De Vries, M.C., Vaughan E.E., Kleerebezema M and de Vosa W.M. 2006. *Lactobacillus plantarum* survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. International Dairy Journal. 16(9):1018-1028

8- Dworkin, MM., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH. and Stackebrandt, E. 2006. The Prokaryotes, 3th ed. Springer: New York, pp 1050–1079.

9- Granato, D., Branco, G.F., Nazzaro, F., Cruz, A.G. and Faria, J.A.F. 2010. Functional foods and nondairy probiotic food: Development trends, concepts and products. Institute of Food Technologists. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 9:292-302.

10- Harrigan, W.F. and Mccance, M.E. 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology. London: Academic Press Inc. 452 pp.

11- Hlebowicz, J., Darwiche, G., Björgell, O. and Almér, L.O. 2007. Effect of apple cider vinegar on delayed gastric emptying in patients with type 1 diabetes mellitus: a pilot study. BMC Gastroentero. (20):7-46.

12- Islam, M.T. and Hossain, M.M. 2012 . Plant probiotics in phosphorus nutrition in crops, with

special reference to rice. Bacteria in Agrobiology: Plant Probiotics. 325-363.

13- Kandler,O. and Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. J. Halt, N.S. Nair , M.E. Sharpe (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 8th ed.1216- 1225.

14- Murray, M.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular wright plant DNA. Nucleic research. 8:4321-4325.

15- Ory, I., Romero, L.E. and Cantero, D. 2004. Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production. Journal of Food Engineering. Journal of Food Engineering. 63(1): 39-45.

16- Rigobelo, E.C. 2012. Probiotis. UNESP Univ Estadual Paulista. Brazil. 600pp.

17- Rivera-Espinoza, Y. and Gallardo-Navarro, Y. 2010. Non-dairy probiotic products. Food Microbiology. 27:1-11.

18- Sharpe, M. E. 1986. The Genus *Lactobacillus*. M.P. Starp, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows , H.G. Schlegel (Eds.), The prokaryotes. Springer-Verlag, Berlin. 1653-1662.

19- Succi, M., Tremonte, P. Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S. and Coppola, R. 2005. Bile salts and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. FEMS Microbiol Lett. 244 : 129-137.

20- Torriani, S., Felis, G. E. and Dellaglio, F. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum , L. pentosus and L. paraplantarum* by *rec* A gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *rec* A gene derived primers. Appl Environ Microbiol. 67:3459-3454.

21- Xu, H., Liu, W., Zhang, W., Yu, J., Song, Y., Menhe, B., Zhange, H. and Sun, Z. 2015. Use of multilocus sequence typing to infer genetic diversity and population structure of *Lactobacillus plantarum* isolated from different sources. BMC Microbiology. 15:241.

Biochemical and molecular identification of probiotic bacteria, "*Lactobacillus plantarum*", isolated from apple vinegar

Nouri S.[1], Nazeri S.[1] and Hosseyni P.[2]

[1] Biotechnology Dept., Bu Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

[2] Medicine of Plant Dept., Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Probiotics are live microorganisms, that their usage in host, strengthen and balance the intestinal microflora and have beneficial effects on host health as well. *Lactobacillus* are the most common type of probiotic microorganisms, which *Lactobacillus plantarum* is one of the most important of these bacteria. Reduction of intestinal infection and gastro-intestinal inflammatory diseases risk, and immune stimulating efficacy are believed provieded by consumption of *Lactobacillus plantarum* containing food products. The purpose of this research is identification the probable presence of bacteria *Lactobacillus plantarum* in apple vinegar using molecular and biochemical methods. Microorganisms were isolated from apple vinegar and some biochemical characteristics such as fermentation of sugars, and extracellular catalase and oxidase enzymes activity, were studied. Molecular identification of strains was performed by specific primer. Their probiotic properties, as ability to grow in different pH and bile salt concentrations, were examined. Of eight microorganisms, isolated from apple vinegar, three strains presented specific band by *Lactobacillus plantarum* specific primers. These bacteria, were gram-positive and catalase and oxidase–negative. These strains grew pretty well in acidic and bile environments. The results showed that apple vinegar could be a good source for isolation of *Lactobacillus plantarum*.

Key words: Probiotics, *Lactobacillus plantarum*, apple vinegar