نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۱ شماره ۴/ سال ۱۳۹۰

بررسی خواص تکنولوژیکی گونه‌های لاکتوباسیل غالب در پنیر سنتی لیقوان

مهدیه حسنی[۱]، جواد حصاری[*۲]، صفر فرج‌نیا[۳] و محمد مقدم واحد[۴]

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲//۲۵

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تبریز
۳- دانشیار مرکز تحقیقات کاربردی- دارویی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
٤- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تبریز
[*]مسئول مکاتبه: E mail: jhesari@tabrizu.ac.ir

چکیده

هدف از این تحقیق جداسازی، شناسایی و بررسی ویژگی‌های تکنولوژیکی گونه‌های لاکتوباسیلوس غالب در پنیر سنتی لیقوان بود. در این تحقیق ۹ نمونه پنیر سنتی لیقوان از سه واحد تولیدی پنیر در منطقه لیقوان واقع در شمال غرب ایران جمع‌آوری گردید. وجود لاکتوباسیل‌ها در پنیرهای خریداری شده مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های جدا شده از پنیرهای مختلف با روشهای فنوتیپیکی در سطح جنس شناسایی گردیدند. در میان سویه‌های جداسازی شده، گونه‌های غالب متعلق به گونه *پلانتاروم* (١٤ سویه جداسازی شده) و گونه *کازئی* (۱۱ سویه جداسازی شده) بودند. ایزوله‌های لاکتوباسیل از نظر میزان تولید اسید، فعالیت پروتئولیتیکی، فعالیت لیپولیتیکی و سرعت اتولیز شدن مورد ارزیابی قرار گرفتند. ۲ سویه بیشترین فعالیت پروتئازی و اسیدی را نشان دادند که یکی از آنها متعلق به گونه *پلانتاروم* و دیگری متعلق به گونه *کازئی* بود. در بین باکتریهای جداسازی شده فقط سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* فعالیت لیپولیتیکی نشان دادند و از نظر فعالیت اتولیتیکی تفاوت معنی‌داری بین دو گونه مشاهده نشد. گونه‌های انتخاب شده از پنیر سنتی لیقوان که در این تحقیق ویژگی‌های تکنولوژیکی مهمی را نشان دادند نه تنها برای کاربردهای عملی به عنوان استارتر یا کمک استارتر مهم هستند بلکه ممکن است مجموعه ژنتیکی ارزشمندی را جهت تولید استارترهای صنعتی با ویژگی‌های معین تأمین نمایند.

واژه های کلیدی: آغازگر، پنیر لیقوان، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، *لاکتوباسیلوس کازئی*

Technological characterisation of predominant *Lactobacilli* isolated from traditional Lighvan cheese

M Hasani[1], J Hesari[2*], S Farajnia[3] and M Moghadam[4]

Received: March 13, 2011 Accepted: March 15, 2012

[1]Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Associate professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
[3]Associate professor, Drug Applied Research Center and Biotechnology Research Center, University of Tabriz of Medical Sciences, Iran
[4] Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

Abstract
The objectives of this study were to isolate and identify predominant strains of *Lactobacilli* in traditional Lighvan cheese and evaluate their technological characterisation. In this study, 9 batches of Lighvan cheese were taken from three dairies in Lighvan village which is located in the North West of Iran. The Lactobacillus bacteria contributing to Lighvan cheese ripening during the different stages of production were investigated. Isolated strains from different culture media were identified phenotypically to species. Among of total isolated strain, the most abundant species belonged to *Lactobacillus plantarum* (14 isolates), *Lactobacillus casei* (11 isolates). The isolates were characterized according to their technological properties including acid production, proteolysis, autolytic activity and lipolysis. Results showed that the highest proteolytic activity and acid production belonged to 2 strains (one strain was *Lb. casei* and another strain was *Lactobacillus plantarum*). Only *Lactobacillus. plantarum* strains showed lipolytic activity and no significant differences (as measured by a paired t-test) were observed between isolates for autolytic activity. Candidate strains isolated from traditional Lighvan cheese, which showed important technological properties, are not only suitable for use as starter cultures or adjuncts but also they may provide a valuable gene pool for production of commercial starters with specific traits.

Keywords: Lighvan cheese, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, Starter

مقدمه

پنیر لیقوان یک پنیر نیمه سخت است که به صورت سنتی از شیر خام گوسفند بدون افزودن هیچ نوع استارتری در منطقه لیقوان واقع در غرب شهر تبریز تهیه می‌شود. این پنیر با توجه به عطر و طعم مطلوب از بازارپسندی بالایی در سراسر ایران برخوردار است. ویژگی‌های میکروبیولوژیکی، شیمیایی و فیزیکی آن به میزان زیادی به کارگاه تولیدی، تجربه شخصی تولید کننده و کیفیت شیر خام وابسته است. بنابراین تهیه محصولی با کیفیت یکنواخت در شرایط سنتی امکان پذیر نیست.

ویژگی‌های خاص پنیرهای سنتی ظاهراً نتیجه‌ای از تنوع جنسها و گونه‌های محلی و فلور میکروبی بومی ویژه شیر است (گارابل و همکاران ۲۰۰۷). بنابراین آگاهی از ترکیب فلور لاکتیکی طبیعی پنیرهای سنتی امکان تهیه استارتر به منظور تهیه محصولی سالم و استاندارد با حفظ ویژگیهای اساسی فرآورده را فراهم می‌آورد (دورلا اوزکایا و همکاران ۲۰۰۱).

در این راستا باکتریهای لاکتیکی غیرآغازگر[۱] غالباً برای محققان و سازندگان پنیر قابل توجه بوده‌اند زیرا

[۱]-Non Starter lactic acid bacteria

افزایش تعداد آنها طی رسیدن پنیر با توسعه ویژگی‌های طعمی و بافتی مثبت و منفی همراه بوده است (سورینگن و همکاران ۲۰۰۱). این باکتریها در طول مدت زمان نسبتاً طولانی رسیدن پنیر زمان کافی برای رشد و تکثیر دارند، به طوریکه با همان سرعت رشد اندک خود در پایان دوره رسیدن به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابند (اورتیگوزا و همکاران ۲۰۰٦). در این رابطه، باکتریهای لاکتیکی که در سطوح بالا در پنیرهای رسیده یافت می‌شوند ممکن است نقش عمده‌ای در رسیدن آنها از طریق فعالیت‌های بیوشیمیایی ایفاء کنند (گارابل و همکاران ۲۰۰۷).

لاکتوباسیلهای هتروفرمنتاتیو اختیاری گروه اصلی فلور غیرآغازگر جدا شده از بسیاری پنیرهای سنتی را تشکیل می‌دهند. این باکتریها نقش اساسی در تولید غذاهای تخمیری نظیر سبزیجات، گوشت و به ویژه محصولات لبنی تخمیری دارند. مطالعات انجام شده تنوع زیستی این جنسها را در پنیر نشان داده است (برناردیو و همکاران ۲۰۰۷). به طور مثال گونه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی*، لاکتوباسیلوس پاراکازئی و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ترکیب اصلی و فلور غالب غیر آغازگر در بسیاری از انواع پنیر از جمله چدار[1]، امنتال[2]، سرادا استرلا[3] و فیوره ساردو[4] بودند (اورتیگوزا و همکاران ۲۰۰٦). مانو و همکاران [5](۲۰۰۰) بر اهمیت حفظ این لاکتوباسیلها در شیر خام اولیه تأکید نمودند زیرا این باکتریها طی مراحل انتهایی رسیدن پنیر، وقتی میکروارگانیسم‌های کشت آغازگر حضور ندارند غالب می شوند و ممکن است اثر مهمی بر رسیدن پنیر و توسعه طعم و آرومای آن داشته باشند. مانولوپولو[6] و همکاران (۲۰۰۳) پس از تحقیق روی فلور میکروبی پنیر فتا[7] گزارش کردند که در پایان مرحله رسیدگی پنیر، که جمعیت کشتهای آغازگر کاهش می یابد، لاکتوباسیلهای مزوفیل در رسیدن پنیر مؤثر بوده و به تشکیل طعم خاص در بسیاری از پنیرها کمک می‌کنند.

امروزه سویه‌های جدید باکتریهای لاکتیکی که سویه-های وحشی نامیده می‌شوند از انواع محصولات لبنی و غیرلبنی جدا شده‌اند.شناسایی و انتخاب این سویه‌های وحشی از پنیرهای ساخته شده به روش سنتی در سراسر جهان به منظور تهیه کشتهای مهم و جدید صنعتی مورد بررسی قرار گرفته است (آیاد و همکاران ۲۰۰٤).استفاده از گونه‌های باکتریهای لاکتیکی در کشتهای آغازگر تجاری به ویژگی‌های تکنولوژیکی و متابولیکی مثل تولید اسید، فعالیت پروتئولیتیکی، میزان اتولیز شدن، ساخت باکتریوسین، مقاومت به باکتریوفاژ و تولید اگزوپلی ساکاریدها وابسته است. (پیرانیو و همکاران ۲۰۰۸). در این راستا بسیاری از محققان (آیاد و همکاران ۲۰۰٤ و داگدمیر اوزدمیر ۲۰۰۸ و پیرانیو و همکاران ۲۰۰۸ و ما و همکاران ۲۰۱۲) به جداسازی و بررسی ویژگی‌های تکنولوژیکی سویه‌های وحشی موجود در محصولات لبنی سنتی پرداخته‌اند و بیان نموده‌اند با توجه به ویژگی‌های تکنولوژیکی مطلوب این سویه‌ها استفاده از آنها در صنعت لبنیات به منظور کمک استارتر یا استارتر امکان‌پذیر است.

تحقیقات انجام شده در سالهای اخیر نشان داده است که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* دو گونه غالب از لاکتوباسیلهای جداسازی شده از پنیر سنتی لیقوان هستند (نوید قاسمی زاد و همکاران ۲۰۰۹ و عبدی و همکاران ۲۰۰٦). هدف تحقیق حاضر جداسازی و شناسایی سویه‌های مختلف این دو گونه در پنیرهای لیقوان و بررسی پتانسیل کاربردی این سویه ها جهت انتخاب استارتر یا کمک استارتر برای تولید محصولات لبنی تخمیری مثل پنیر صنعتی بود.

[1]-Cheddar
[2]-Emmental
[3]-Serrada Estrella
[4]-Fiore sardo
[5]-Mannu
[6]-Manolopoulou
[7]-Feta

۲- مواد وروش ها

۲-۱- جداسازی و شناسایی ایزوله ها

ابتدا ۹ نمونه پنیر لیقوان با ۳ ماه رسیدگی از ۳ کارگاه لبنیاتی در روستای لیقوان در دی ماه ۱۳۸٦ تهیه و تا هنگام انجام آزمونها در یخچال در دمای ٤°C نگهداری شدند. به منظور آنالیزهای میکروبی، ٥ گرم نمونه تحت شرایط استریل به ٤٥ میلی لیتر محلول استریل سیترات سدیم ۲٪ (وزنی/حجمی) در دمای ٤٥ درجه سانتی گراد اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه توسط هاون استریل هموژن گردید، تا رقت ۰/۱ به دست آید (لیتوپولو و همکاران ۱۹۹۲). رقتهای اعشاری در محلول آب پپتونه ۰/۱ ٪ (وزنی/حجمی) تهیه گردیدند (کایاگیل ۲۰۰٦). رقتهای 10^{-2} تا 10^{-5} بصورت پورپلیت در محیط کشت روگازا آگار[1] با سه تکرار کشت داده شدند. این محیط حاوی غلظت بالای استات است که همراه با pH پایین (حدود ٥/٤) محیط انتخابی مناسبی برای رشد لاکتوباسیلهای مزوفیل فراهم می‌آورد. البته گاهی پدیوکوکها و لوکنوستکها هم در این محیط رشد می‌کنند اما لاکتوباسیلهای ترموفیل قادر به رشد در این محیط نیستند (مارشال ۱۹۹۲). پس از گرمخانه‌گذاری پلیتها در دمای ۳۰°c به مدت ٤۸ ساعت، کلنی‌هایی که از لحاظ شکل، اندازه، کدورت یا شفافیت و سایر ویژگی‌های ظاهری متفاوت بودند به صورت جداگانه بر سطح پلیتهای حاوی محیط فوق ۲-۳ بار کشت داده شدند تا عمل خالص‌سازی و جداسازی صورت گرفت. برای مدت کوتاه کلنی‌ها در محیط کشت MRS آگار در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و هر ٤ هفته یکبار کشت مجدد صورت گرفت (عبدی ۲۰۰٦). همه کلنی‌های جداسازی شده سپس برای تعیین گرم، فعالیت کاتالازی، مورفولوژی سلولی و تولید گاز از گلوکز در محیط MRS مایع حاوی لوله دورهام مورد آزمایش قرار گرفتند (ماتارا و همکاران ۲۰۰٤ و سادیک و همکاران، ۲۰۰۲). کلیه باکتریهای میله‌ای شکل، گرم مثبت و کاتالاز منفی که از گلوکز تولید گاز نکردند به عنوان لاکتوباسیل در نظر گرفته شدند (نوید قاسمی زاد ۱۳۸۳). به منظور شناسایی باکتریهای جداسازی شده در سطح گونه تخمیر کربوهیدراتها (ریبوز، سوربیتول، رافینوز، رامنوز، ملی بیوز، لاکتوز، مانیتول، مانوز، گالاکتوز، گلوکز، سالسین، سوربوز، فروکتوز، ساکاروز و مالتوز) در محیط پایه با فرمول ذیل پیگیری شد : ۰/۸٪ عصاره مخمر، ۰/۸٪ تریپتون، ۱/۲پپتون، ۰/۱٪ توئین ۸۰ و ۰/۰۰٤٪ برموفنل بلو به عنوان معرف و ۲٪ غلظت قند نهایی (لاسردا و همکاران، ۲۰۰٥)، برای تأمین شرایط بی‌هوازی ۱ میلی‌لیتر پارافین مایع استریل بر سطح محیط قندی اضافه گردید (تورزلانز ۲۰۰٦). کلیه کشت‌ها در سه تکرار انجام شد.

نتایج آزمونهای ایزوله‌های شناسایی شده با خصوصیات بیوشیمیایی اسیدلاکتیک باکتریها در کتاب راهنمای برگیس (جدول شماره ۱)مطابقت داده شد (اسنیس و همکاران ۱۹۸٦).

۲-۲- توانایی تولید اسید

سویه‌های باکتریهای جداسازی شده که ۲٤ ساعت قبل ازآزمون در محیط MRS مایع جوان شده بودند به میزان ۱٪ به محیط شیر بدون چربی بازساخته[2] ۱۰٪ استریل تلقیح شدند و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید. pH ابتدایی شیر (pH=٦/٥) به عنوان pH اولیه یادداشت گردید و تغییرات pH بعد از ٦ و ۲٤ ساعت برای هر سویه اندازه‌گیری شد (دورلا اوزکایا و همکاران ۲۰۰۱).

۲-۳- تعیین فعالیت پروتئولیتیکی

تعیین فعالیت پروتئولیتیکی به روش کیفی صورت گرفت. به این منظور باکتریهای شناسایی شده بر روی پلیت حاوی محیط شیر بدون چربی بازساخته ۱۰٪

[1]-Rogasa Agar

[2]- شیری است که از اختلاط شیر خشک بدون چربی و آبی با کیفیت شیمیایی و باکتریولوژیک مناسب (مطابق با استانداردهای شماره 1053، 191، 162، 2012 ایران) تهیه شده و بعد از همگن کردن استریل شده است.

آگاردار کشت شدند و به مدت ۱۸-۲۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردیدند. کلنی‌هایی که اطراف آنها هاله شفاف تشکیل شد به عنوان سویه-های دارای فعالیت پروتئولیتیکی در نظر گرفته شدند (سورینگن و همکاران، ۲۰۰۱).

۲-۴- تعیین فعالیت اتولیتیکی

اتولیز شدن باکتریها به روش پیرانیو و همکاران (۲۰۰۸) در دو بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مول بر لیتر (pH=۷) و ۱ میلی مول بر لیتر کلرید سدیم + ۱۰ میلی مول بر لیتر فسفات پتاسیم (pH=۵/۵) ارزیابی شد. برای این منظور۱ میلی لیتر از محیط حاوی هر سویه باکتری به میکروتیوپ‌های استریل منتقل شد. میکروتیوپ‌ها در ۱۲۰۰۰×g به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفوژ (Avant 30i Beckman) شدند. مایع رویی هر تیوپ بیرون ریخته شد و رسوب باکتریایی باقیمانده در ته هر میکروتیوپ ۲ بار با محلول کلرید سدیم ۰/۸۵٪ (w/v) استریل شستشو گردید. سپس توده‌های باکتریایی باقیمانده در هر میکروتیوپ با ۱ میلی لیتر از بافر اتولیز کننده نیمه گرم مخلوط شدند و در دمای ٤۰°c گرمخانه گذاری گردیدند (پیرانیو و همکاران، ۲۰۰۸).

OD_{650}[۱] در آغاز گرمخانه‌گذاری به عنوان OD_{0} اندازه گیری شد و بعد از ۱۸۰ دقیقه OD_{180} یادداشت شد. نتایج به صورت سرعت اتولیز شدن (RA) و مقدار اتولیز شدن (EA) بیان شد:

$$RA = \frac{OD_0 - OD_{180}}{180}$$

$$EA = \frac{OD_0 - OD_{180}}{OD_0}$$

[۱]-Optical Density

۲-۵- تعیین فعالیت لیپولیتیکی

فعالیت لیپولیتیکی سویه‌ها به روش کیفی و با استفاده از شناساگر رنگی نیل بلو سولفات ارزیابی گردید (نوراینی و همکاران ۱۹۹۹ و کولینز و هامر ۱۹۳۳). باکتریهایی که شب قبل در محیط MRS مایع جوان شده بودند بر روی محیط پایه‌ای با فرمول: ۰/۵٪ عصاره گوشت، ۰/۵٪ عصاره مخمر، ۰/۵٪ پپتون، ۰/۵٪ گلوکز، ۱/۵٪ آگار و ۵٪ کره، کشت داده شدند و سپس به مدت یک هفته در دمای محیط گرمخانه گذاری گردیدند. کلنی‌هایی که پس از یک هفته گلبولهای چربی در اطراف آنها سبز-آبی یا آبی شدند به عنوان هیدرولیز کننده چربی (لیپولیتیک) شناسایی شدند (استارک و اسچیب ۱۹۳۵).

۲-۶- آنالیز آماری داده‌ها

در این پژوهش هریک از ۲ گونه *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان یک جامعه آماری در نظر گرفته شد و مقایسه میانگین‌های این دو جامعه با آزمون t-test انجام گرفت. کلیه آزمونهای انجام شده در سه تکرار صورت گرفت.

۳-نتایج

۳-۱- جداسازی و شناسایی گونه‌ها

در این تحقیق با استفاده از روشهای فنوتیپی (الگوی تخمیر کربوهیدراتها) مجموعاً ۲۵ سویه غالب لاکتوباسیلوس پلانتاروم و *لاکتوباسیلوس کازئی* از ۹ پنیر جداسازی و شناسایی شدند. تمامی سویه‌ها گرم مثبت، کاتالاز منفی و میله‌ای شکل بودند و از گلوکز گاز تولید نکردند، بنابراین در دسته لاکتوباسیلوسهای هتروفرمنتاتیو اختیاری قرار گرفتند. همچنین به دلیل رشد در ۱۵ درجه سانتیگراد و عدم رشد در ٤۵ درجه سانتیگراد به عنوان لاکتوباسیلهای مزوفیل در نظر گرفته شدند (بالوس و همکاران، ۱۹۹۱). با استناد به جدول تخمیر قندها (در کتاب راهنمای برگیس، اسنیس و همکاران ۱۹۸٦) توسط لاکتوباسیلهای مزوفیل هتروفرمنتاتیو گونه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به

علت تخمیر هر دو قند رافینوز و ملی‌بیوز از گونه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* که قادر به تخمیر هیچ کدام ازین دو قند نیستند قابل تشخیص هستند (قطبی و همکاران، ۱۳۸۹). بنابراین از مجموع ۲۵ سویه جداسازی شده غالب، ۱۱ سویه متعلق به گونه *لاکتوباسیلوس کازئی* و ۱٤ سویه متعلق به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بودند. توانایی ایزوله‌ها در تخمیر قندها در جدول شماره یک نشان داده شده است. این باکتریها بر طبق تحقیقات انجام شده توسط نوید قاسمی‌زاد وهمکاران (۱۳۸۳) و عبدی و همکاران (۲۰۰٦) نیز به عنوان گونه‌های غالب در پنیر سنتی لیقوان شناسایی شده‌اند. در سایر پنیرهای سنتی گوسفندی نیز نتایج مشابهی گزارش شده است: به عنوان مثال در پنیر فیوره ساردو[۱] (پنیر سنتی ایتالیایی تهیه شده از شیر خام گوسفند)، پنیر آرمادا (نوعی پنیر اسپانیایی تهیه شده از شیر خام بز) و سواک تولو (پنیر نیمه سختی که در ترکیه از شیر خام گوسفند تهیه می شود) لاکتوباسیلهای هتروفرمنتاتیو اختیاری مثل لاکتوباسیلوس پلنتاروم و *لاکتوباسیلوس کازئی* در فاز رسیدن غالب بودند (مانگیا و همکاران ۲۰۰۸). در این رابطه اورتیگوزا (۲۰۰٦) بیان نمود سطح بالای لاکتوباسیلهای هتروفرمنتاتیو بدست آمده در پنیرهای ساخته شده از شیر خام اهمیت این گروه باکتریها را طی رسیدن تأیید می‌کند و ممکن است این باکتریها در خصوصیات طعمی پنیر موثر باشد.

[۱]-Fiore Sardo

جدول ۱- نتایج آزمون قندها برای لاکتوباسیلهای جدا شده از پنیرهای سنتی لیقوان

پنیر لیقوان خریداری شده	باکتری شناسایی شده*	سویه باکتری	ریبوز	سوربیتول	رافینوز	رامنوز	ملیبیوز	لاکتوز	گالاکتوز	گزیلوز	مالتوز	مانوز	فروکتوز	ساکاروز	گلوکز	سالیسین	مانیتول	گلوکونات
نمونه پنیر۱ (سه بسته)	سویه *L. plantarum*	P1	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		P2	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		P3	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		P4	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		P5	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		P6	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
	سویه *L. casei*	C1	+	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		C2	+	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		C3	+	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
نمونه پنیر۲ (سه بسته)	سویه *L. plantarum*	P7	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		P8	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		P9	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		P10	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		P11	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
	سویه *L. casei*	C4	+	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		C5	+	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		C6	+	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
نمونه پنیر۳ (سه بسته)	سویه *L. plantarum*	P12	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		P13	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		P14	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
	سویه *L. casei*	C7	+	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		C8	+	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		C9	+	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		C10	+	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
		C11	+	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+

* تطابق الگوی تخمیر قند برای تعیین گونه‌های جداسازی با جدول تخمیر لاکتوباسیلهای هتروفرمنتاتیو در کتاب برگیس انجام شد (اسنیس و همکاران ۱۹۸٦)

۳-۲- فعالیت اسیدی سویه‌ها

اسید لاکتیک عامل ایجاد طعم اسیدی تازه در پنیر تازه است و در تشکیل بافت دلمه نیز نقش دارد. توانایی لاکتوباسیلها برای کاهش pH به وسیله تولید اسید از قند منجر به گسترش ویژگی‌های حسی مطلوب، جلوگیری از رشد میکروبهای بیماریزا و اطمینان از ماندگاری و سلامت فرآورده نهایی می‌شود(کایاگیل ۲۰۰٦). در این تحقیق سویه‌های جداسازی شده توانایی‌های متفاوتی را برای کاهش pH شیر نشان دادند، اما همه سویه‌ها پس از ٦ ساعت pH شیر را از ۰/۱ (P3) تا ۰/٦۲ (P6) تغییر دادند. بنابراین با توجه به تغییرات کم pH در شیرهای تلقیح شده پس از ٦ ساعت می‌توان بیان نمود سرعت تولید اسید در سویه‌ها نسبتاً پایین است. این نتایج در توافق با نتایج بدست آمده توسط داگدمیر و اوزدمیر (۲۰۰۸) و ما و همکاران (۲۰۱۲) است. داگدمیر[۱] و اوزدمیر[۲] (۲۰۰۸) گزارش نمودند لاکتوباسیلهای

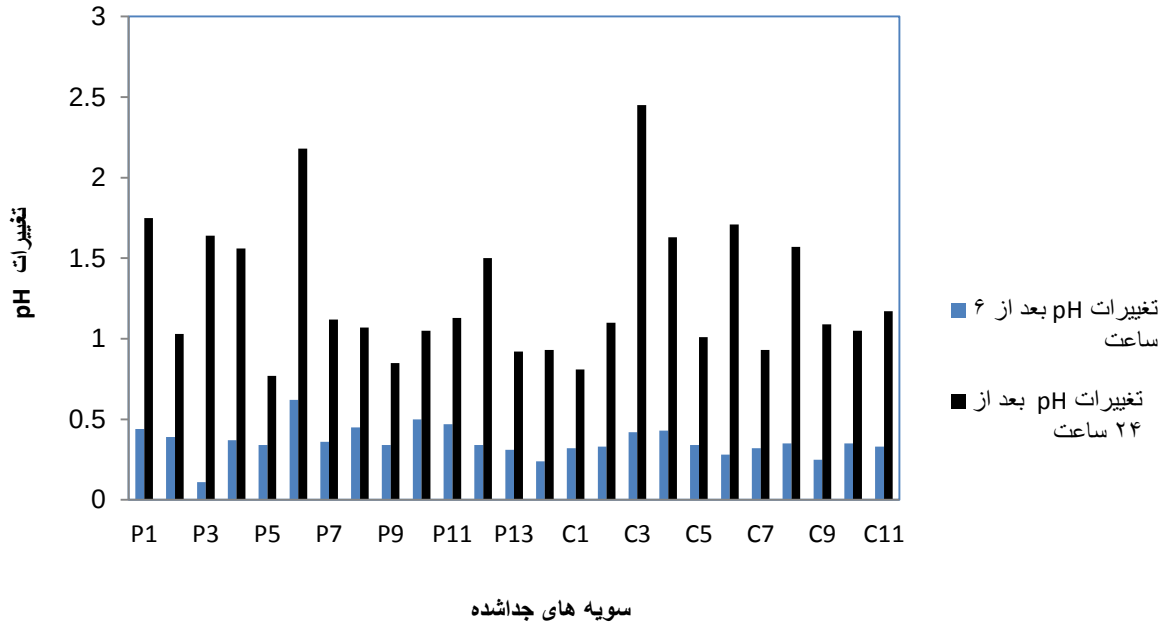
[۱]-Dagdemir
[۲]-Ozdemir

جداسازی شده از پنیر سفید ترش ترکیه‌ای[۱] طی ٦ ساعت گرمخانه‌گذاری با سرعت کمی اسید تولید کردند. همچنین ما و همکاران (۲۰۱۲) بیان کرده‌اند تغییرات pH ایجاد شده توسط لاکتوباسیلهای جداسازی شده از شیرهای تخمیری سنتی چین طی ٦ ساعت بسیار پایین و از ۰/۰٤ تا ۰/٦٥ بود. دامنه تغییرات pH پس از ۲٤ ساعت برای سویه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی شده از ۰/۷۷ تا ۲/٤٥ بود (شکل ۱). در این بین کلاً ٦ سویه (۳ سویه متعلق به گونه لاکتوباسیلوس پلنتاروم و ۳ سویه متعلق به گونه لاکتوباسیلوس کازئی) بعد از ۲٤ ساعت pH را بین ۱/٥ تا ۲ واحد کاهش دادند. همچنین دو سویه C3 و P6 با ΔpH=۲/٤٥ و ΔpH=۲/۱۸ بیشترین کاهش pH طی ۲٤ ساعت را سبب شدند.

لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کازئی ممکن است لاکتوز را از طریق فعالیت β-گالاکتوزیداز تخمیر کنند (دورلا اوزکایا، ۲۰۰۱). در تحقیق انجام شده توسط پیرانیو[۲] (۲۰۰۸) نیز در بین گروه باکتریهای لاکتیکی غیر استارتری ٤ گونه بیشترین کاهش pH را بعد از ۲٤ ساعت نشان دادند که عمدتاً مربوط به جنس لاکتوباسیلوس و یکی از آنها *لاکتوباسیلوس کازئی* بود. همچنین مانگیا[۳](۲۰۰۸) بیان داشت بیشتر لاکتوباسیلهای جدا شده از شیر خام گوسفند و پنیر فیوره ساردو توانایی تولید اسید متوسط تا بالایی را طی ۲٤ ساعت نشان دادند که این نتایج مشابه با ویژگی های تولید اسید این ایزوله ها در پنیر آرمادا بود. در تحقیق حاضر ۸ سویه توانستند پس از ۲٤ ساعت pH اولیه شیر را به کمتر از ٥ کاهش دهند که بیانگر توانایی تولید بالای اسید توسط این باکتریها طی ۲٤ ساعت و قابلیت بالای سویه‌ها در استفاده به عنوان استارتر و کمک استارتر است.

---

[۱]-Turkish White Pickled cheese
[2]-Piraino
[3]-Mangia



شکل ۱- تغییرات pH در نمونه شیر خشک بدون چربی بعد از ۶ و ۲۴ ساعت
c: سویه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و p: سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

۳-۳- فعالیت پروتئولیتیکی سویه‌ها

تولید محصولات لبنی تخمیری با کیفیت بالا وابسته به سیستم‌های پروتئولیتیکی باکتریهای استارتری است (آیاد و همکاران، ۲۰۰۳). بنابراین به علت نقش قابل توجه پروتئولیز در توسعه طعم، توانایی پروتئولیتیکی باکتریهای لاکتیکی غیراستارتری یک ویژگی مهم فنوتیپی محسوب می‌شود. فعالیتهای پروتئازی آنزیمی استارتری و غیراستارتری به تولید پپتیدها و اسیدهای آمینه آزاد منجر می‌شود (سورینگن وهمکاران، ۲۰۰۱). اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای تشکیل شده اثر مستقیم بر روی طعم دارند یا به صورت پیش سازهای ترکیبات مولد عطر وطعم از طریق واکنشهای کاتابولیک ثانویه در این محصولات نقش بازی می‌کنند. داکو (۱۹۹۵) نشان داد که فعالیت پروتئازی لاکتوباسیلها از لاکتوکوکسی‌ها بیشتر است. سویه‌های شناسایی شده در این تحقیق فعالیتهای پروتئازی متفاوتی نشان دادند. در این بین ٤ سویه بیشترین فعالیت پروتئازی را نشان دادند که ۲ سویه از آنها بیشترین فعالیت اسیدی را نیز دارا بودند (جدول شماره ۲). این نتایج در تضاد با نتایج گارابل (۲۰۰۷) و دورولواوزکایا (۲۰۰۱) است که بیان نمودند هیچ رابطه‌ای بین فعالیت اسیدی و فعالیت پروتئولیتیکی سویه‌های جدا شده از پنیرهای گالاکیا[1] و بیاض[2] نبود زیرا در مطالعه انجام شده سویه‌هایی با فعالیت اسیدی بالا غالباً فعالیت پروتئولیتیکی مناسبی نیز نشان دادند. ما و همکاران (۲۰۱۲) نیز با بررسی فعالیت پروتئولیتیکی لاکتوباسیلهای جدا شده از شیرهای تخمیری بیان نمودند گونه‌های لاکتوباسیلوس دارای توانایی متفاوتی در فعالیت پروتئولیتیکی هستند و سویه‌هایی با بالاترین فعالیت پروتئولیتیکی عموماً میزان pH را نیز به شکل قابل توجهی کاهش دادند. وجود پروتئاز متصل به دیواره سلولی در *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* توسط السودا و هگازیگزارش شده است. پروتئیناز متصل به دیواره سلولی دلیل اصلی تجزیه پروتئینهای خارج سلولی مثل

[1]-Galicia
[2]-Beyaz

کازئینها است. پروتئیناز دیواره سلولی این دو نوع لاکتوباسیل ترجیحاً α_{s1}- و κ- کازئینها را هیدرولیز می-کنند. همچنین *لاکتوباسیلوس کازئی* دارای فعالیت آمینوپپتیدازی، دی پپتیدازی، کربوکسی پپتیدازی و اندوپپتیدازی است، در حالیکه لاکتوباسیلوس پلنتاروم فعالیت آمینوپپتیدازی و دی پپتیدازی درون سلولی دارد اما فعالیت کربوکسی پپتیدازی و اندوپپتیدازی محدودی دارا می‌باشد (نوراینی و همکاران ۱۹۹۹).

جدول ۲- فعالیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکیلاکتوباسیلهای جدا شده از پنیر سنتی لیقوان

نوع سویه	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
فعالیت پروتئولیتیکی	+	+	+	+*	+	+*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+*	+	+	+	+*	+	+	+	+
فعالیت لیپولیتیکی	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

c: سویه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و p: سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

+:سویه‌ها دارای فعالیت پروتئولیتیکی یا لیپولیتیکی بودند

-: عدم وجود فعالیت پروتئولیتیکی یا لیپولیتیکی

*+: بیشترین فعالیت مشاهده شده (بیشترین قطر هاله شفاف ایجاد شده)

۳-۴- فعالیت اتولیتیکی سویه‌ها

در تحقیق حاضر بین دو نوع لاکتوباسیلوسهای پلانتاروم ولاکتوباسیلوسهای کازئی جداسازی شده از نظر میزان اتولیز شدن اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. اما بیشترین فعالیت اتولیتیکی در بین سویه های جداسازی شده مربوط به سویه های P_5 و P_7 از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود. همچنین بیشترین میزان اتولیز شدن در تطابق با یافته‌های پیرانیو و همکاران (۲۰۰۸) در pH=۷ بدست آمد. نتایج حاصل از این آزمون به صورت حداکثر، حداقل و متوسط فعالیت اتولیتیکی در بافرهای مورد آزمون در جدول ۳ بیان شده است.

طبق تحقیق انجام شده توسط پیرانیو و همکاران (۲۰۰۸) بالاترین سرعت لیز شدن (بیش از ۰,۲۵ واحد ODدر ساعت) و بیشترین میزان اتولیز شدن (بیش از ۷۰٪ واحد OD) مربوط به گروه باکتریهای لاکتوکوکسی و اسید لاکتیک باکتریهای غیر استارتری بود. بر طبق تحقیقات آنها تفاوت معنی‌داری بین سایر گروههای باکتریایی (گونه‌های لاکتوباسیلوس هلوتیکوس، لاکتوباسیلوس فرمنتوم و استرپتوکوکوس ترموفیلوس) از نظر میزان اتولیز شدن مشاهده نشد. در این راستا ما و همکاران (۲۰۱۲) نیز بیان کردند میزان اتولیز شدن لاکتوباسیلهای جدا شده از شیرهای تخمیر شده سنتی چینی رنجی بین ۱۰٪ تا ٤٥٪ داشته‌اند. در تحقیق آنها سویه‌های جداسازی شده از لاکتوباسیلها شناسایی نشده بودند.

توانایی گونه‌ها به لیز شدن و پس از آن خروج آنزیمهای درون سلولیشان یک ویژگی مطلوب در رسیدن پنیر محسوب می‌شود. درجه اتولیز شدن باکتریها به گونه وابسته است (آیاد و همکاران ۲۰۰٤). آنزیمهای خروجی طی لیز شدن نقش کلیدی در تشکیل اسیدهای آمینه مولد ترکیبات طعمی بازی می‌کنند و این دسته از گونه‌ها برای تشکیل طعم در ساخت محصولات لبنی تخمیری مورد توجه هستند (لورتال و همکاران ۲۰۰۵). در بررسی که بر روی خصوصیات اتولیتیکی انواعی از پنیرها در رابطه با میکروارگانیسم‌هایشان

انجام شده بود نشان داده شد که یک راه موثر برای تسریع رسیدن پنیر افزودن کشتهای الحاقی؛ به طور عمده گونه‌های لاکتوباسیلوس و انتخاب این کشتها براساس پروفیل‌های آنزیمی و ویژگی‌های اتولیز شدن آنهاست (هانون و همکاران۲۰۰۲).

جدول۳- میزان و سرعت اتولیز شدن سویه‌ها در بافرهای مختلف مورد استفاده

گونه	اتولیز شدن			
	میزان(-)		سرعت($ODmin^{-1}$)	
	$K_3PO_4/NaCl$ pH: ۵/۵	K_3PO_4 pH: ۷	$K_3PO_4/NaCl$ pH: ۵/۵	K_3PO_4 pH: ۷
لاکتوباسیلوس کازئی				
حداقل	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۰	۰/۰۰
حداکثر	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۰۰	۰/۰۱
متوسط	۰/۰۶	۰/۰۸	۰/۰۰	۰/۰۰
لاکتوباسیلوس پلانتاروم				
حداقل	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰
حداکثر	۰/۳۶	۰/۳۸	۰/۰۳	۰/۰۳
متوسط	۰/۰۹۶	۰/۱۲	۰/۰۰	۰/۰۱

۳-۵- فعالیت لیپولیتیکی سویه‌ها

در آزمون انجام شده پس از ۹ روز دو سویه متفاوت P_2 و P_8 از گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در محیط چربی آگاردار رشد کردند و ویژگی‌های هیدرولیز چربی را نشان دادند. اما هیچ یک از سویه های *لاکتوباسیلوس کازئی* فعالیت لیپولیزی از خود نشان ندادند (جدول شماره ۲).

فرآیند هیدرولیز چربی شیر است که نقش قطعی در گسترش طعم در انواع گسترده‌ای از پنیرها بازی می-کند. ترکیبات طعمی اصلی که طی لیپولیز خارج می شوند اسیدهای چرب آزاد هستند که اثر مستقیم بر طعم پنیر دارند (هلند و همکاران ۲۰۰۵). لاکتوباسیلها فعالیت لیپولیتیکی ضعیفی دارند، با این وجود آنها دلیلی برای لیپولیز شدن پنیرهای ساخته شده از شیر خام هستند (نوراینی و همکاران ۱۹۹۹). در تحقیق انجام شده توسط اوترهولم[1] (نقل از نوراینی و همکاران ۱۹۹۹) بر روی ۹ گونه از باکتریهای لاکتیکی مشخص شد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بیشترین فعالیت استرازی را داشته و تری-استین را هیدرولیز می‌کند. محققان دیگر نیز این طور استنتاج کردند که آنزیم خالص سازی شده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بیشتر یک استراز است تا لیپاز(هلند و همکاران ۲۰۰۵). در تحقیق انجام شده توسط هلند[2]و همکاران (۲۰۰۵) دو استراز از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی گردید که قادر به هیدرولیز تری بوترین و تری کاپرین بودند.

نتیجه گیری کلی

در مجموع می‌توان بیان نمود، سویه‌هایی که در این تحقیق براساس ویژگی‌های تکنولوژیکی مهم انتخاب شدند مثل سویه‌های P_6 و C_3 با حداکثر تولید اسید ، سویه های P_5 و C_7 با حداکثر اتولیز شدن و سویه‌هایی با فعالیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی می‌توانند به عنوان استارتر یا کمک استارتر در محصولات لبنی صنعتی استفاده شوند. این باکتریها امکان تهیه محصولاتی با

[1]-Oterholm

[2]-Holland

ویژگی‌های سنتی در مقیاس صنعتی را فراهم می‌آورند، اما استفاده مناسب از آنها به شرایط ویژه و مطالعات بیشتری نیاز دارد. گونه‌های انتخاب شده از پنیر لیقوان که خواص ذاتی مهمی را نشان دادند ممکن است مجموعه ژنتیکی گسترده‌ای را جهت طراحی گونه‌های تغییر یافته ژنتیکی با ویژگی‌های مورد نظر تأمین نمایند.

منابع مورد استفاده

قطبی م، سلیمانیان‌زاد صبیحه و شیخ زین الدین م، ۱۳۸۹. شناسایی گونه‌های لاکتوباسیلوس هتروفرمنتاتیو اختیاری در پنیر لیقوان. نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران ٦: ١٤٥-١٤٨.

Abdi R, Sheikh-Zeinoddin M and Soleimanian-Zad S, 2006. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian Lighvan cheese. Pakistan Journal of Biological Sciences 9: 99-103.

Ayad EHE, Nashat S, EL-Sadek N, Metwaly H and EL-Soda M, 2004. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyption dairy products according to production and technological criteria. Journal of Food Microbiolog 21: 715-725.

Balows A, Truper, HG, Dworkin M, Harder W and Schleifer KH, 1991. The Procaryotes. 2nd Edn., Springer-Verlag, New York, NY: 385-413.

Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S and Gueguen M, 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus. Journal of Food Microbiology 126: 278-285.

Collins MA and Hammer BW, 1933. The action of certain bacteria on some simple tri- glycerides and natural fats, as shown by nile –blue sulphate. Journal of the Iowa Agricultural Experiment 160: 473-486.

Dagdemir E and Ozdemir S, 2008. Technological characterization of the natural lactic acid bacteria of artisanal Turkish white pickled cheese. International Journal of Dairy Technology 61: 133–140.

Durlu-Ozkaya F, Xanthopoulos V, Tunail N and Litopoulou-Tzanetaki E, 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewe's milk. Journal of Applied Microbiology 91: 861-870.

Garabal IJ, Rodriguez-Alonso P and Centeno JA, 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cow's milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain). LWT-Food Science and Technology 41(8): 1452-1458.

Hannon JA, Wilkinson MG, Delahunty CM, Wallace JM, Morrissey PA and Beresford TP, 2002. Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. International Dairy Journal 13: 313-323.

Holland R, Liu SQ, Crow VL, Delabre ML, Lubbers M, Bennlt M and Norris G, 2005. Esterases of lactic acid

bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcolyis and esterification. International Dairy Journal 15, 711-718.

Kayagil F, 2006. Effect of traditional starter cultures on quality of cheese. As a thesis for the degree of Master Science. Department of Biotechnology, Middle East Technical University. Ankara..

Lacerda ICA, Miranda RL, Borelli BM, Nunnes AC, Nardi RMD, Lachance M and Rosa CA, 2005. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour Cassava starch in Brazil. International Journal of Food Microbiology 105: 213-219.

Litopoulou-Tzanetakia E and Tzanetakis N, 1992. Microiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. Food Microbiology 9: 12-19.

Lortal S and Chapot-Chartier MP, 2005. Role, mechanisms and contral of lactic acid bacteria lysis in cheese. International Dairy Journal 15:857-871.

Ma C, Ang L, Ma D, Du M, Han H, Yi H, Zhang L, Feng Z, Zhang Y and Song W, 2012. Technological characterization of Lactobacilli isolated from Chinese artisanal fermented milks. International Journal of Dairy Technology 65:132-139.

Mangia NP, Murgia MA, GarouSanna MG and Deiana P, 2008. Influence of selected lactic acid bacteria cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. Journal of Food Microbiology 25: 366–377

Manolopoulou E, Sarantinopoulos V, Zoidou E, Aktypis A, Moschopoulou E, Kandaraki GI and Anifantakis EM, 2003. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. International Journal of Food Microbiology 82: 153-161.

Marshal RT, 1992. Standard methods for the examination of dairy products. 16th Edition, American public health Association.

Mathara JM, Schillinger U, Kutima PM, Mbugua SK and Holzapfel WH, 2004. Isolation, identification and characterization of the dominant microorganisms of Kule naoto: the Masai traditional fermented milk in Keaya. International Journal of Food Microbiological 94: 269-278.

Mannnu L, Comunian R and Sciutu MF, 2000. Mesophilic Lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. International Dairy Journal 10: 383-389.

Noraini MK and Elmer HM, 1990. Lactobacilli- Their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review. Journal of Dairy Science 73: 2669-2684.

Ortigosa M, Arizcun C, Irigoyen A, Oneca M and Torre P, 2006. Effect of lactobacillus adjunct cultures on the microbiological and physicochemical characteristics of Roncal- type ewe's milk cheese. Journal of Food Microbiology 23: 591-598.

Piraino P, Zotta T, Ricciardi A, McSweeny PLH and Parenle E, 2008. Acid productin, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from Pasta filata cheese: A multivariate screening study. International Dairy Journal 18: 81-92.

Sadic O, Arico M and Simsek O, 2002. Selection of starters for a traditional Turkish Yayik butter made from yoghurt. Food Microbiology 19: 303-312.

Sneath PHA, Mair NS, Sharp ME and Holt JG, 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology Vol 2, P. Williams& Wilkins, Baltimore.

Stark CN and Scheib BJ, 1935. A study of fat splitting and casein digesting bacteria isolated from butter. Journal of Dairy Science 19: 191-213.

Swearingen PA, O'sullivan DJ and Warthesen JJ, 2001. Isolation, characterization and influence of native non starter lactic acid bacteria on Cheddar cheese quality. Journal of Dairy Sciences 84: 50-59.