Archive Of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال اول، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحه ۴۱- ۵۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۸/۰۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۳

جداسازی و بررسی میزان تولید اسید لاکتیک در لاکتوباسیلوس‌های بومی استان چهارمحال و بختیاری جداسازی شده از محصولات لبنی

الهام سرمست قهفرخی: دانشجوی کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، ایران، sarmast.eli@gmail.com *
محسن مبینی دهکردی: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه شهرکرد، ایران، mmobinid@gmail.com
کیوان بهشتی مآل: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، ایران، kbeheshtimaal@yahoo.com

چکیده

مقدمه: قرن‌هاست که باکتری‌های اسیدلاکتیک در محصولات لبنی تخمیری به دلیل مشارکت در ایجاد عطر و طعم، بافت و در بسیاری موارد خواص پروبیوتیکی اسفاده می‌شوند. از آن‌جایی که کشت‌های آغازگر لاکتیکی در تولید مقدار بهینه اسید لاکتیک در فرآیند تولید انواع پنیر و ماست، استفاده می‌شوند، بررسی سویه‌های بومی مولد اسید لاکتیک می‌تواند با اهمیت باشد.

مواد و روش‌ها: جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها با کمک محیط کشت MRS از نمونه‌های مختلف انجام شد. سپس، بررسی تنوع و ویژگی‌های لاکتوباسیل‌های موجود در نمونه‌های مختلف از لحاظ توانایی تولید دی اکسید کربن از گلوکز، توانایی رشد در اسیدیته‌های ۲/۵۰ تا ۸/۵۰، غلظت‌های مختلف نمک ۱/۵۰ تا ۱۰ درصد (وزنی/حجمی) و دماهای ۱۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. همچنین، توانایی حرکت باکتری‌ها، تولید اندول و تولید سولفید هیدروژن نیز بررسی شد. میزان تولید اسید لاکتیک کل در محیط شیر بدون چربی به روش تیتراسیون با سود یک درصد به شکل کمی محاسبه و میزان حضور ایزومر L–لاکتات با استفاده از کیت رندوکس[1] انگلستان بررسی شد.

نتایج: در این بررسی از ۳۰ نمونه ماست و پنیر بومی نقاط مختلف استان ۴۳ جدایه باسیل‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و اکسیداز منفی جداسازی شدند. همه جدایه‌ها به اسیدیته ۲/۵ مقاوم بودند و به ترتیب ۳۰ و ۶۹ درصد نمونه‌ها به غلظت‌های ۷/۵ و ۱۰ درصد نمک حساس بودند. بیشترین تولید اسید لاکتیک در یکی از جدایه‌ها برابر با ۱/۸ درصد و L- لاکتات ۶/۸ گرم بر لیتر بود. این جدایه بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی به عنوان لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس شناسایی شد.

بحث و نتیجه‌گیری: در اکثر جدایه‌ها میزان تولید اسید لاکتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بیشتر از دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد که از نظر آماری در سطح یک درصد معنا دار بود. با توجه به تولید مطلوب اسید لاکتیک در جدایه بومی و تحمل مناسب اسیدیته و نمک در آن، زمینه ای مناسب برای مطالعات تکمیلی و زمینه‌سازی برای کاربرد آن در صنایع غذایی فراهم است.

واژه‌های کلیدی: جداسازی، باکتری‌های اسید لاکتیک، اندازه‌گیری اسیدلاکتیک، محصولات لبنی

* نویسنده مسؤول مکاتبات

www.SID.ir

Archive Of SID

مقدمه

باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)[۲] گروه هتروژنی از باکتری‌های گرم مثبت هستند که بر اساس مجموعه ای از ویژگی‌های ریخت‌شناسی، متابولیک و فیزیولوژیک در یک گروه بسیار بزرگ قرار گرفته‌اند. اگرچه هسته مرکزی این گروه بسیار بزرگ را جنس‌های لاکتوباسیلوس[۳]، پدیوکوکوس[۴]، لوکونوستوک[۵]، لاکتوکوکوس[۶] تشکیل می‌دهند، به مرور جنس‌های دیگری به این گروه اضافه شدند تا جایی که امروزه باکتری‌های اسید لاکتیک حدود ۲۰ جنس را در بر می‌گیرند (۱). لاکتوباسیلوس‌ها از مهم‌ترین جنس‌های این خانواده محسوب می‌شوند که به تنهایی شامل ۸۰ جنس شناخته شده اند. این جنس یک گروه ناهمگن، شامل گونه‌هایی با تنوع وسیعی از خصوصیت‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی است. ناهمگونی این گروه، به دلیل وجود ۳۲ تا ۵۵ در صد مجموع بازهای G-C در DNA گونه‌های این جنس است، که این مقدار، دو برابر میزان معمول و قابل قبول برای طبقه بندی یک جنس تک است. لاکتوباسیل‌ها، گرم مثبت، میکروآئروفیل به شکل میله‌های بلند، باریک و گاهی خمیده تا کوتاه هستند و بیشتر به شکل باسیل‌های کوچک‌تر کورینه فرم یا کوکوباسیل مشاهده می‌شوند. ارلا-جنسن[۷]، طی تحقیقاتی که انجام داد، توانست لاکتوباسیل‌ها را به سه زیر جنس ترموباکتریوم، استرپتوباکتریوم و بتاباکتریوم تقسیم کند. جنس لاکتوباسیلوس شامل گونه‌هایی است که می‌توانند در هر سه گروه قرار گیرند و این موضوع در حقیقت اساس طبقه بندی به سه گروه است.

لاکتوباسیل‌ها بخش مهمی از گروه بزرگ باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک هستند و از اجزای اصلی فلور میکروبی محصولات لبنی، کشت آغازگر محصولات لبنی تخمیری و انواع غذاهای تخمیری دیگر مانند سوسیس و کالباس شناخته می‌شوند. این باکتری‌ها در طعم فرآورده‌های غذایی دخالت دارند و به شکل پروبیوتیک‌های غذایی استفاده می‌شوند (۲). اسید لاکتیک مهم‌ترین محصول آن‌ها از تخمیر کربوهیدرات‌ها محسوب می‌شود. اسیدلاکتیک به دو شکل فعال نوری L(+) و D(-)، وجود دارد. به‌دلیل مصرف فراوان اسید لاکتیک و مشتقات آن در صنایع غذایی، نساجی، دارویی، آرایشی، شیمیایی و به‌ویژه پلیمری، اهمیت توجه و بررسی تولید این اسید آلی پر کاربرد توسط باکتری‌های اسید لاکتیک از اهمیت زیادی برخوردار است (۳).

استان چهارمحال و بختیاری دارای تنوع وسیعی از محصولات لبنی بومی است و به همین دلیل می‌تواند بستری مناسب برای بررسی تنوع زیستی، به‌ویژه در سطح میکروب‌های اسید لاکتیک باشد. شرایط زیستی منحصر به فرد، تنوع، گستردگی و از همه مهم‌تر نبود سابقه بررسی‌های مشابه، بر لزوم انجام پژوهش‌های بیشتر برای یافتن باکتری‌های دارای پتانسیل صنعتی و همچنین باکتری‌های جدید در این مناطق تاکید دارد. هدف از انجام این پژوهش، بررسی ماست و پنیرهای بومی و سنتی مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری از نظر وجود لاکتوباسیل‌ها، دستیابی به جدایه‌های جدید و با کارآیی بالاتر در تولید اسید لاکتیک برای تحقیق‌های آینده بود.

www.SID.ir

Archive Of SID

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها

۳۰ نمونه ماست و پنیر بومی از دامداری‌های سنتی ۱۱ منطقه مختلف استان چهارمحال و بختیاری تهیه و با شرایط استریل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی

همه نمونه‌ها بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه ورتکس شده، و یک سی سی از رقت‌های 10^{-1} و 10^{-4} از هر نمونه در محیط آگارMRS[8] به شکل کشت خطی در سطح محیط کشت داده شدند. پلیت‌ها برای مدت ۴۸ ساعت در در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به شکل هوازی گرمخانه‌گذاری شدند (۴).

شناسایی

پس از پایان زمان انکوباسیون، کلونی‌های غیر مشابه که از لحاظ شکل، اندازه، کدر یا شفاف بودن و سایر ویژگی‌های ظاهری متفاوت بودند به شکل جداگانه کشت داده شدند. از تک کلونی‌های خالص برداشت شد و به روش گرم رنگ آمیزی شدند. سپس، آزمایش‌های اکسیداز و کاتالاز انجام شد (۵). آزمون حرکت، تولید اندول و سولفیدهیدروژن نیز انجام شد (۶). توانایی رشد در دماهای مختلف ۱۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد پس از ۲۴ ساعت، تحمل به غلظت نمک‌های مختلف ۱/۵، ۲/۵، ۵/۰، ۷/۵ و ۱۰/۰ (درصد، وزنی/حجمی)، تولید گاز از گلوکز در محیط MRS براث حاوی لوله دورهام، توانایی رشد دراسیدیته های ۲/۵، ۴/۵، ۶/۰ و ۸/۵ آزمایش شدند (۷ و ۸).

تعیین فعالیت اسیدی سویه‌ها

سویه‌های جدا شده جوان ۲۴ ساعته، به میزان یک درصد (وزنی/حجمی) به محیط شیر بدون چربی ۱۰ درصد (وزنی/ حجمی) استریل تلقیح شده و در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. در بازه‌های زمانی ۲۴ ساعته تغییرات اسیدیته و درصد تولید اسیدلاکتیک به روش تیتراسیون با سود یک درصد برای هر سویه اندازه‌گیری شد (۹). سویه‌ای که بیشترین تولید اسیدلاکتیک در محیط شیر بدون چربی داشت انتخاب و مقدار فرم انانتیومری L-لاکتات با استفاده از کیت آنزیمی رندوکس انگلستان اندازه‌گیری شد (۱۰). بدین شکل که ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاصل از رشد باکتری در محیط شیر بدون چربی و پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری ۷۲ ساعته، با ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم لاکتات پراکسیداز و معرف TOOS (N-اتیل-N-۲-هیدروکسی-۳-سولفوپروپیل-m-تولوئیدن) کیت مخلوط کرده و جذب نوری حاصل در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. همگی آزمون‌ها سه بار تکرار شدند.

تحلیل آماری

برای انجام تحلیل‌های آماری از نرم افزار SPSS 17.0.0 و آزمون‌های آماری ANOVA و t-Test استفاده شد.

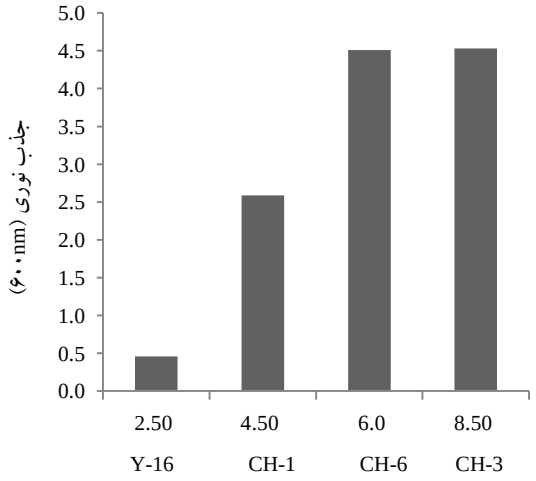
نتایج

همه کلونی تک سفید تا کرمی با قطر ۱ تا ۱/۵ سانتیمتر جداسازی شده، رنگ آمیزی گرم مثبت و شامل ۲۳ باسیل طویل ۲ تا ۶ میکرومتر و ۲۰ باسیل کوتاه و خمیده با طول ۲ تا ۴ میکرومتر بودند. آزمایش کاتالاز و اکسیداز برای همه باسیل‌ها منفی بود. همچنین، آزمایش حرکت، تولید سولفید هیدروژن و اندول برای همه جدایه‌ها منفی مشاهده شد. همه جدایه فاقد توانایی تولید دی اکسیدکرین از گلوکز بودند.

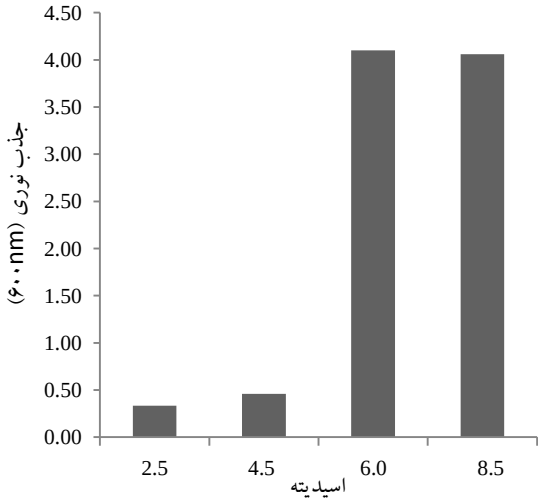
www.SID.ir

Archive Of SID

میزان جذب نوری جدایه‌ها پس از گرمخانه‌گذاری ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط‌های تنش نمک و اسید و باز، به دست آمد و پس از تهیه رقت، جذب نهایی محاسبه شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که جدایه‌های خالص شده فاقد توانایی رشد در اسیدیته ۲/۵ بودند و در اسیدیته ۴/۵ توانایی رشد را داشتند. بهترین رشد سویه‌ها در اسیدیته ۶/۵ و به نسبت کمتر در اسیدیته ۸/۵ بود که قابلیت تحمل و رشد مناسبی داشتند. جدایه‌هایی که بیشترین مقاومت و رشد را در اسیدیته‌های مختلف از جمله اسیدیته برابر ۸/۵۰ داشتند در شکل ۱ و میزان رشد ایزوله Y-۲۵ در اسیدیته های مختلف در شکل ۲ آمده است. اختلاف مورد مشاهده بین جدایه‌های شاخص از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنا دار است(P value <0.05).



شکل ۱- نمودار حداکثر رشد بهترین جدایه‌های مقاوم در اسیدیته‌های مختلف در محدوده ۲/۵۰ تا ۸/۵۰ پس از ۲۴ ساعت

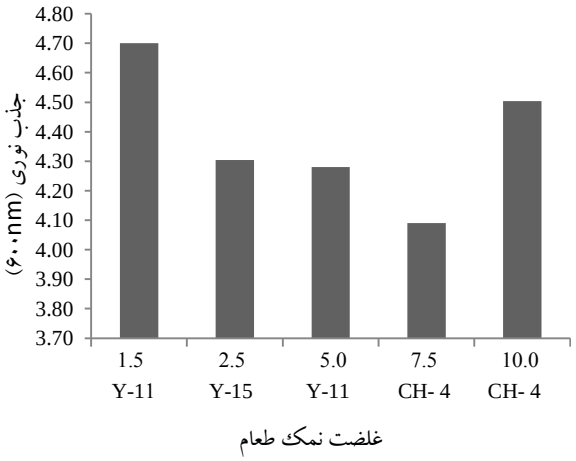


شکل ۲- نمودار حداکثر رشد ایزوله Y-۲۵ در اسیدیته های مختلف در محدوده ۲/۵۰ تا ۸/۵۰ پس از ۲۴ ساعت

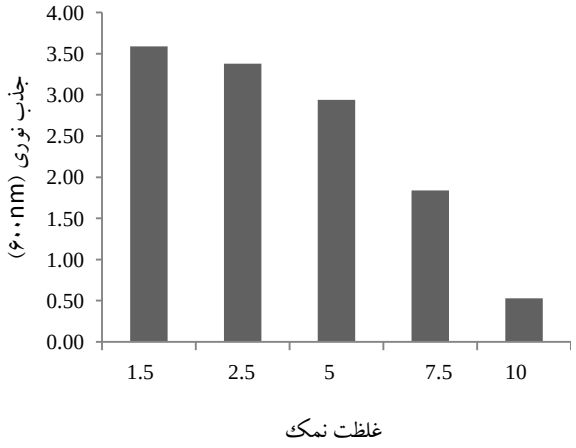
جدایه‌های جداسازی شده توانایی مقاومت و رشد در غلظت نمک ۱/۵ و ۲/۵(درصد، وزنی/حجمی) را داشته و به خوبی در این محیط رشد کردند. تنها ۲ جدایه تحمل به غلظت نمک ۵/۰ درصد کمتری داشته و در حقیقت کمابیش به این غلظت نمک حساس بودند. میزان رشد باکتری‌ها و مقاومت سویه‌ها در غلظت‌های نمک ۷/۵ و ۱۰/۰ درصد در همه جدایه‌ها کاهش یافته به طوری‌که به ترتیب ۱۳ و ۳۵ سویه از کل ۴۳ سویه جداسازی شده، به غلظت ۷/۵ و ۱۰/۰ درصد نمک حساس بوده و فاقد توانایی تحمل و رشد در این غلظت‌های بالای نمک بودند. بهترین جدایه‌های مقاوم به غلظت‌های مختلف نمک در شکل ۳ و نمودار رشد جدایه Y-۲۵ در غلظت‌های مختلف نمک در شکل ۴ آمده است. اختلاف مورد مشاهده بین جدایه‌های شاخص در سطح ۵ درصد معنا دار است (P value <0.05).

www.SID.ir

Archive Of SID



شکل ۳- نمودار حداکثر رشد جدایه‌های شاخص مقاوم به غلظت‌های مختلف نمک پس از ۲۴ ساعت



شکل ۴- نمودار حداکثر رشد جدایه Y-۲۵ در غلظت‌های مختلف نمک پس از ۲۴ساعت

نتیجه آزمایش توانایی رشد در دماهای ۱۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد ۳۰ جدایه توانایی رشد در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد داشتند و ۱۳ جدایه نیز قادر به رشد در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد بودند. نتایج به دست آمده مشخص کرد که همه جدایه‌های جداسازی شده توانایی تولید اسید لاکتیک در محیط شیر بدون چربی را داشته و توانستند پس از گذشت ۲۴ ساعت میزان در خور توجهی اسید تولید کنند. همچنین با توجه به آزمایش‌های انجام شده مشخص شد که لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده توانایی بهتری در تولید اسید با توجه به شرایط دمایی ۳۷ نسبت به ۲۵ درجه سانتی‌گراد دارند. این اختلاف در تولید اسید لاکتیک در بیشتر جدایه‌ها در سطح یک درصد معنا دار است. در جدایه‌های Ch-۳ و Y-۶ و Y-۱۵ اختلاف در تولید اسید لاکتیک در دو دمای مذکور معنا دار نبود. بیشترین میزان تیتر اسیدلاکتیک در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پس از گذشت ۷۲ ساعت برابر با ۰/۴۸۱ درصد و اسیدیته ۴/۶۳ مربوط به جدایه Y-۲۵ بود که همین جدایه بیشترین تولید اسیدلاکتیک را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارد. پس از گرمخانه‌گذاری محیط شیر بدون چربی همراه با این سویه توانست اسیدیته شیر را تا حدود ۳/۶۴ کاهش دهد و در نهایت ۱/۸۱ درصد اسیدلاکتیک تولید نماید. میزان تیتر اسید لاکتیک برای جدایه‌هایی که بیشترین تولید را در محیط شیر بدون چربی و دو دمای۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به ترتیب در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است. مقدار درصد اسیدلاکتیک در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای جدایه Y-۲۵ در شکل ۵ آمده است. اختلاف در میزان اسید لاکتیک تولید شده در دو دمای مختلف از نظر آماری در سطح یک درصد معنا دار است (P value <0.01). اندازه‌گیری فرم L- لاکتات تولید شده، این مقدار برابر با ۶/۸ گرم بر لیتر بود که از مقدار اسید لاکتیک کل تیتر شده توسط سود یک درصد کمتر بوده و مشخص شد که سویه جداسازی شده هر دو فرم انانتیومری L و D اسیدلاکتیک را تولید کند. نتایج تخمیر قندها در جدایه Y-۲۵ در جدول ۳ آمده است.

www.SID.ir

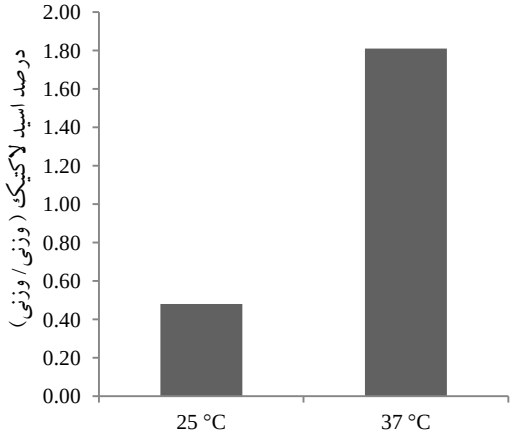
Archive Of SID

جدول ۱- جدایه‌هایی با بیشترین تولید اسیدلاکتیک و میزان تیتر اسید در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

نمونه		۲۴			۴۸			۷۲		
		تیتر با NaOH ۱ درصد	درصد اسیدلاکتیک	اسیدیته	تیتر با NaOH ۱ درصد	درصد اسیدلاکتیک	اسیدیته	تیتر با NaOH ۱ درصد	درصد اسیدلاکتیک	اسیدیته
Ch-۷	باسیل کوتاه	۱/۷۶	۰/۱۳۶	۵/۹۳	۳/۰۵	۰/۳۶۹	۴/۵۹	۳/۶۷	۰/۴۸۱	۴/۶۳
Y-۲۵	باسیل کوتاه	۱/۶۶	۰/۱۸۸	۵/۹۷	۲/۰۱	۰/۱۸۱	۵/۷۸	۲/۳۶	۰/۲۴۴	۵/۴۱
Y-۲۹	باسیل کوتاه	۲/۶۴	۰/۲۹۵	۵/۲۴	۲/۴۷	۰/۲۶۴	۵/۱۸	۳/۳۱	۰/۴۱۵	۴/۸۷

جدول ۲- جدایه‌هایی با بیشترین تولید اسیدلاکتیک و میزان تیتر اسید در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

نمونه	کد	۲۴			۴۸			۷۲		
		تیتر با NaOH ۱ درصد	درصد اسیدلاکتیک	اسیدیته	تیتر با NaOH ۱ درصد	درصد اسیدلاکتیک	اسیدیته	تیتر با NaOH ۱ درصد	درصد اسیدلاکتیک	اسیدیته
Ch-۳	باسیل کوتاه	۱/۴۰	۰/۰۷۲	۶/۰۰	۳/۶۴	۶/۱۲	۴/۲۳	۹/۸۹	۱/۶۰	۳/۷۱
Ch-۶	باسیل کوتاه	۲/۱۴	۰/۲۰۵	۵/۵۸	۵/۵۱	۰/۸۱۱	۴/۲۷	۹/۲۵	۱/۴۸	۳/۹۱
Y-۲۵	باسیل کوتاه	۲/۵۷	۰/۲۸۲	۵/۲۶	۶/۸۳	۱/۰۴۹	۴/۱۵	۱۱/۱۶	۱/۸۳	۳/۶۴



شکل ۵- نمودار درصد اسیدلاکتیک تولید شده در جدایه Y-۲۵ پس از ۷۲ ساعت در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد

جدول ۳- نتایج تخمیر قندها در جدایه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

قند	سلوبیوز	لاکتوز	گالاکتوز	مالتوز	مانیتول	مانوز	ملیبیوز	رافینوز	سالیسین	سوکروز	ترهالوز	ریبوز	سوربیتول
ایزوله y-۲۵	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	−	−

www.SID.ir

Archive Of SID

بحث و نتیجه‌گیری

اهمیت باکتری‌های اسید لاکتیک در بحث صنعت و سلامت هر روز بیشتر می‌شود. در این بین کشور ما یکی از وارد کننده‌های سویه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک و فرآورده‌های آن‌ها طی سال‌های گذشته بوده است. هدف از این تحقیق، شناسایی لاکتوباسیل‌ها و اندازه‌گیری میزان اسیدلاکتیک تولید شده توسط این سویه‌های بومی جداسازی شده از ماست و پنیر سنتی مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری بوده است تا امکان بررسی و دستیابی به باکتری‌های دارای قابلیت صنعتی مناسب در زمینه‌های مختلف را ایجاد کند.

اسیدی یا بازی بودن یک محیط تأثیر زیادی بر ثبات و فعالیت مولکول‌های بزرگ نظیر آنزیم‌ها دارد. از این رو جای تعجب نیست که رشد و متابولیسم میکروارگانیسم‌ها به وسیله اسیدیته تحت تأثیر قرار می‌گیرد. به دلیل این که باکتری‌های اسید لاکتیک در نتیجه فرآیند متابولیسم تولید انرژی، قادر به تولید مقدار زیادی اسید هستند، می‌توان نتیجه گرفت که این باکتری‌ها به طور مکرر تحت شرایط تنش اسید قرار می‌گیرند.

مقاومت به اسید و باز

سویه‌های جداشده از نمونه‌های لبنی استان چهارمحال و بختیاری توانایی چشمگیری در تحمل به شرایط اسیدی و قلیایی داشتند و توانستند در اسیدیته ۴/۵، ۶/۰ و ۸/۵ به خوبی رشد کنند. این درحالی است که همه جدایه فاقد توانایی رشد در اسیدیته‌های خیلی اسیدی (۲/۵) بودند. با وجود این‌که ۴ جدایه توانایی رشد در اسیدیته ۴/۵ را داشته و کدورت در خور توجه در این اسیدیته ایجاد کردند، برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیک در اسیدیته‌های نزدیک به ۳/۲، برخی دیگر تا اسیدیته‌های ۹/۶ و بیشتر آن‌ها در اسیدیته‌های بین ۴/۰ و ۴/۵ رشد می‌کنند (۱۱). همه جدایه‌های جداسازی شده در این تحقیق نیز دامنه وسیعی در مقاومت و رشد تحت اسیدیته‌های اسیدی و کمی بازی از خود نشان دادند. توانایی رشد دراسیدیته‌های پایین در بین باکتری‌های اسیدلاکتیک متفاوت است که این نتیجه در راستای تحقیق‌های انجام شده توسط ایبورهما و همکاران[9] است (۱۲). بهترین رشد سویه‌های جداسازی شده در اسیدیته ۶ بود که همه سویه‌ها حداکثر رشد را داشتند همچنین همه جدایه‌ها توانستند رشد در خور توجه در اسیدیته ۸/۵ نشان دهند. این مشاهدات نشان می‌دهد که بهینه رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک در رنج اسیدیته ۶ تا ۶/۴ است. این نتیجه با نتایج گزارش شده توسط شده توسط پانسار و همکاران[10] مطابقت دارد (۱۳). در اسیدیته‌های پایین نزدیک به ۴، با تولید اسید و خروج آن از سلول باکتری به محیط، اسیدیته سلول باکتری بالاتر از محیط اطراف باکتری می‌شود. در نتیجه پروتون‌ها به درون سلول نفوذ کرده و باکتری برای بیرون راندن این پروتون‌ها احتیاج به انرژی دارد که این عمل باعث کند شدن رشد می‌شود. اگر اسیدیته خارجی خیلی پایین (در حدود ۲/۵ تا ۳) باشد و غلظت اسید خارج سلولی بالا باشد، فشار وارده به سلول به میزان زیادی افزایش می‌یابد و بنابراین اسیدیته سیتوپلاسم نیز کاهش یافته و میزان آن به سطحی می‌رسد که دیگر رشد ممکن نیست و احتمالا سلول باکتری می‌میرد (۱۴). رولو و همکاران[11]، ۳ مکانیسم مختلف برای مقاومت اسیدیته پیشنهاد کرده اند این مکانیسم ها شامل H^+–ATPase، مسیر دآمینازشدن

www.SID.ir

Archive Of SID

آرژنین و واکنش گلوتامات دکربوکسیلاز است. پمپ $H^+-ATPase$ ، پروتون‌ها را از طریق هیدرولیز ATP از سلول بیرون می‌راند و هرچقدر که میزان اسید تولید شده بیشتر و درحقیقت اسیدیته پایین‌تر رود، فعالیت این پمپ نیز افزایش می‌یابد و ATP بیشتری مصرف می‌شود. درنتیجه به رشد سلول خسارت وارد می‌شود و رشد کند و حتی متوقف می‌شود (۱۵).

مقاومت به نمک طعام

نمک طعام یک عامل دخیل اصلی در پنیر است که تأثیر عمده بر روی ترکیب، فلور میکروبی، رسیدن، بافت، طعم و کیفیت آن دارد (۱۶). مقاومت به نمک یکی از ویژگی‌های اساسی برای باکتری‌های آغازگر مورد استفاده در صنعت پنیرسازی است که سویه‌های جداسازی شده در این تحقیق با توجه به مقاومت به غلظت‌های نمکی می‌توانند کاربرد فراوانی داشته باشند. بر اساس نتایج بدست آمده سویه‌ها ی جداسازی شده بومی توانایی خوبی برای رشد در محیط‌های با غلظت‌های نمکی متفاوت نشان داند و توانستند به نمک طعام با غلظت ۱/۵ و ۲/۵ درصد (وزنی/حجمی) مقاومت کنند. بهترین رشد در غلظت نمکی ۱/۵ درصد است و این نتیجه مشابه یافته‌های هوگو و همکاران و الزته و آر.اس.[۱۲] بود (۸ و ۱۷). آتاسور و ادی گزل[۱۳] نیز گزارش کردند که همگی باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از سوسیس در غلظت ۲/۵ و ۴ درصد نمک رشد کردند (۷). بررسی‌های ساندرز[۱۴] بر روی لاکتوکوکوس لاکتیس نشان داد که تحت شرایط تنش ۲/۵ درصد نمک (مقدار نمک موجود در برخی از انواع پنیر)، میزان رشد از ۲۵ تا ۵۰ درصد نسبت به شرایط بدون تنش کاهش می‌یابد و همچنین سنتز پروتئین‌ها تا حدود ۵۰ درصد تنزل می‌کند. درحالی‌که در باکتری‌های مقاوم به غلظت‌های بالاتر نمک، سنتز حداقل ۱۲ پروتئین تحریک می‌شود که این پروتئین‌ها به نام پروتئین‌های تحریکی- نمکی شناخته می‌شوند. همچنین این باکتری‌ها می‌توانند به وسیله شوک حرارتی نیز تحریک شوند. ClpP یکی از پروتئین‌های شوک حرارتی است که حین تنش نمک تحریک می‌شود و پس از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در محیط غلظت نمک ۲/۵ درصد، ۴ پیچش اضافی در ساختمان این پروتئین ایجاد می‌شود. این موضوع مطرح شده است که در سویه‌های مقاوم به نمک لاکتوکوکوس لاکتیس، اجتماع نامناسب پروتئین‌های غشا، باعث ایجاد یک سد دفاعی برای تحمل به نمک در باکتری است (۱۸).

تحمل دمایی

باکتری‌های اسیدلاکتیک دامنه تحمل دمایی متفاوتی دارند. از باکتری‌های سایکروتروف با دامنه دمایی ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد، باکتری‌های مزوفیل با رنج دمایی ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد و همچنین ترموفیل‌ها با بهینه دمای رشد ۵۵ تا ۷۵ درجه سانتی‌گراد گسترده هستند. باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسازی شده از نمونه‌های لبنی استان دارای رنج دمایی متفاوتی هستند. این جدایه‌ها به خوبی در دمای۳۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد کردند. از بین سویه‌های جداسازی شده ۱۳ سویه جداسازی شده شامل باسیل‌های کوتاه و بلند توانایی رشد در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد را داشتند و ۳۰ جدایه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد رشد کردند. این نشان می‌دهد که باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسازی شده از نمونه‌های ماست و پنیر بومی استان چهارمحال و بختیاری بیشتر از گونه‌های مزوفیل بودند. این نتیجه مغایر با گزارشی است

www.SID.ir

Archive Of SID

که در آن گونه‌های مزوفیل گونه‌های غالب باکتری‌های اسید لاکتیک در پنیر لیقوان هستند (۱۹).

فعالیت اسیدی سویه‌ها

از مهم‌ترین شاخص‌های دخیل در مقبولیت فرآورده‌های لبنی تخمیری از جمله ماست و پنیر، خصوصیت‌های بافتی آن‌ها است که شروع لخته شدن کازئین شیر با اضافه کردن کشت‌های آغازگر و تولید اسید لاکتیک و در نهایت پایین آمدن اسیدیته تا محدوده ۴/۶ آغاز می‌شود. نخستین وظیفه کشت آغازگر تبدیل تخمیری قند شیر به تولیدات اسیدی است که به ماندگاری، طعم، مزه و ساختار محصول لبنی تخمیری کمک می‌کند (۱۶). لاکتوباسیل‌ها قادرند اسیدیته مواد غذایی را که دارای یک کربوهیدرات قابل تخمیر هستند به ۴ برسانند (۱۱). مقدار اسیدیته قابل سنجش ماست نباید از ۰/۷ درصد بر حسب درصد وزنی/وزنی اسید لاکتیک کمتر باشد (۱۶) (استاندارد ملی ایران شماره ۶۹۵). باکتری‌های میله ای حدود ۰/۶. تا ۰/۸ درصد اسید لاکتیک تولید می‌کنند (۱۱). اما میزان تولید اسید در سویه‌های جداسازی شده متفاوت بود که بدلیل شرایط و توانایی متابولیکی سویه‌های بکار رفته است. بهترین دمای رشد برای تولید اسید در باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده برابر با ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود. این نتیجه با نتیجه گزارش شده توسط هادادجی و بن سلطان[15] برای باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدیوباکتریوم لانگوم جداسازی شده از نمونه‌های ماست فرانسه، بین ۳۷ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد، هم‌خوانی دارد (۲۰).

در نهایت، مشخص شد که بیشترین تولید اسید در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد پس از گذشت ۷۲ ساعت برابر با ۱/۸۳ درصد اسیدلاکتیک و اسیدیته نهایی ۳/۶۱ است. درگزارش یالیانا و همکاران[16] بیشترین مقدار تولید اسید لاکتیک پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برابر با ۰/۶۲ درصد و اسیدیته ۳/۷۹ آمده است (۲۱). نتایج بدست آمده نشان داد تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در طی دوره تخمیر بالا می‌رود ولی با توجه فعالیت باکتری‌ها، سرعت افزایش آن‌ها متفاوت است و در نتیجه میزان تولید اسیدلاکتیک توسط این سویه‌ها متفاوت است. بررسی اخیر مشخص کرد که تولید اسیدلاکتیک با زمان انکوباسیون افزایش می‌یابد و این نتیجه در راستای گزارش هوگو و همکاران[17] و محمود و همکاران[18] است (۸ و ۲۲).

کمترین مقدار تولید اسید ۰/۲۵۲ و اسیدیته ۵/۳۲ برای باسیل جداسازی شده از منطقه دیگری است، پس می‌توان این طور نتیجه گرفت که این تفاوت بین تولید اسید لاکتیک توسط باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از مناطق مختلف وجود دارد. این یافته با گزارش‌های هادادین[19] تطبیق دارد. وی توضیح داد که سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس جدا شده از شمال امریکا ممکن است به طور ژنتیکی با یک گونه مشابه در اروپا یا خاورمیانه متفاوت باشد (۲۳). این نتیجه با نتایج هوگو و همکاران مطابقت ندارد به این دلیل که در میزان تولید اسید لاکتیک لاکتوباسیل‌های مناطق مختلف بنگلادش تفاوت معنی داری وجود ندارد (۸).

در اسیدیته ۵، نزدیک به اسیدیته ایزوالکتریک کازئین (۴/۶)، بافت مناسب ماست به دنبال افزایش پیوندهای هیدروفوب و تولید اسید لاکتیک ایجاد می‌شود. سویه‌هایی که اسیدیته ۴/۶ را ایجاد کردند شامل ۸۲/۶۰ درصد بودند. این نتیجه با نتیجه واسیلن و همکاران[20] همخوانی دارد که سویه‌های صنعتی استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس

www.SID.ir

Archive Of SID

بولگاریکوس توانستند اسیدیته ۴/۵۷ و میزان اسید لاکتیک ۰/۷۸ درصد را تیتر کردند (۲۴).

تولید اسیدلاکتیک توسط لاکتوباسیلوس‌ها به سه عامل وابسته است، محیط کشت، اسیدیته محیط مورد نظر برای تولید اسید و دمای گرمخانه‌گذاری. شرایط متفاوت خارج از سلول باکتری می‌تواند تأثیر مستقیم بر فعالیت کاتالیکی آنزیم‌ها (D یا L-لاکتات دهیدروژناز) یا تمایل آنزیم به سوبسترا (پیروات) داشته باشد (۲۵).

مقدار بالای تولید اسید لاکتیک به دست آمده در این تحقیق پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری و کشت یک ارگانیسم به دست آمد. درحالی که در صنعت به دلیل ترکیب ۲ ارگانیسم کشت آغازگر به شکل همزمان در محیط شیر در مدت زمان کوتاه‌تری اتفاق می‌افتد و این به دلیل تأثیر سینرژیسمی دو ارگانیسم نسبت به یکدیگر است که رشد و تولید اسید را تحریک می‌کند. این مطابق با گزارشی است که لنگ کی و آدریانی[۲۱] منتشر کردند مبنی بر این‌که میزان تولید اسید هنگامی‌که ۲ ارگانیسم کشت آغازگر با یکدیگر کشت داده شوند نسبت به زمانی که به شکل مجزا کشت داده شوند، بیشتر است (۲۶).

یکی از خصوصیت‌های لاکتوباسیلوس‌ها توانایی تولید هر دو فرم انانتیومری L و D-لاکتات است، برای این منظور مقدار فرم L-لاکتات برای سویه ای که بیشترین تولید اسید را داشت پس از ۷۲ ساعت با استفاده از کیت آنزیمی اندازه‌گیری شد که این میزان برابر با ۶/۸ گرم/ لیتر بود. پانسار با استفاده از لاکتوباسیلوس کازئی میزان L-لاکتات برابر ۳۳/۷۳ گرم بر لیتر پس از ۳۶ ساعت را به دست آورد (۱۳).

پیشنهادات

باکتری‌های شناسایی شده در این پژوهش می‌توانند در آینده به عنوان استارتر و یا کمک استارتر در محصولات لبنی تخمیری با توجه به ویژگی مورد نیاز فرآورده به کار روند. اما اثر ترکیب گونه‌ها در تولید ترکیبات معطر و افزایش کیفیت محصول نیاز به آزمایش‌های دقیق‌تر در واحد آزمایشگاهی دارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده بتوان در نخستین گام به وسیله روش‌های نوین تشخیصی بانک‌های میکروبی قابل قبولی از این سویه‌های بومی مناطق بکر ایجاد کرده و نیز تحقیقاتی بر پایه نحوه بکارگیری این باکتری‌ها، بهینه‌سازی در تولید بیشترین مقدار اسیدلاکتیک و همچنین شرایط دمایی متفاوت انجام شود و در مراحل بعد با بررسی ویژگی‌های یافته‌ها، به سوی استفاده صنعتی از آن‌ها حرکت کرد.

تشکر و قدردانی

از کلیه افرادی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند به ویژه جناب آقای مهندس نظری مدیر محترم اداره کل استاندارد استان چهارمحال و بختیاری تشکر و قدردانی می شود.

References

(1) Forghani F, Nazmi AS, Sharif Sh, Eskandari M. Isolation and molecular identification of lactic acid bacteria in raw milk Central Alborz heights using 16S rDNA PCR Sequencing and High Resolution Melting Real Time PCR. *J. Microbial Biotech Research Islamic Azad University* 1389; 2 (5): 21-28.

(2) Lars A. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In, Hoang-Dung T, Fennema O, Hui Y, Walstra P, Karel M, et al. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3th ed. New York, USA, Marcel Dekker Inc. 2004, p 18-85.

www.SID.ir

Archive Of SID

(3) Abdallyzadeh, M. Farahani Vasheghani, Ps. Khodabandeh, M. Hashemi Najaf –Abadi S. Production of lactic acid fermentation in non-continuous optimization process whey by *Lactobacillus casei* bacteria. *J. Food Sci* 1389; 7 (2): 95-102.

(4) El Soda M, Ahmed N, Omran N, Osman G, Morsi A. Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheesemaking. Emir. *J. Agric.Sci.* 2003; 15(2): 51-71.

(5) Abdullah A.S, Osman M.M. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Raw Cow Milk, White Cheese and Rob in Sudan. *Pakistan J. Nutrition* 2010; 9(12): 1203-06.

(6) Abd El Gawad I, Abd El Fatah A, Al Rubayyi K. Identification and Characterization of Dominant Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Rayeb Milk in Egypt. *J. American Sci* 2010; 6(10): 728-35.

(7) Adiguzel G.C, Atasever M. Phenotypic and Genotypic Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Turkish Dry Fermented Susage. *Romanian Society of Biological Sciences* 2009; 14 (1): 4130-38.

(8) Hoque M. Z, Akter F, Hossain K.M, Rahman M.S, Billah M.M, Islam K.M.D. Isolation identification and analysis of probiotic properties of *Lactobacillus Spp*. From selective regional yoghurts. *World J. Dairy & Food Sci* 2010; 5 (1): 39-46.

(9) National Standard No. 2852 – milk and its products – Determination of acidity and pH-test 1385.

(10) Mirdamadi S, Sadeghi H, Sharafi N, Fallahpour M, Aziz Mohseni F, Bakhtiari M.R. Comparison of Lactic Acid Isomers Produced by Fungal and Bacterial Strains. Iranian Biomedical Journal 2002; 6 (3): 69-75.

(11) M. J Jay, Lansr M, Goldenberg D. *Modern Food Microbiology*. As translator. Mortazavi H, Zyaalhq R. 2nd. ed. Mashhad: Mashhad Ferdowsi University Press 1389; 1, p 793.

(12) Ibourahema C, Dauphin R, Jacqueline D, Thonart Ph. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Poultry Farms in Senegal. *African J. Biotech* 2008; 7(12): 2006-2012.

(13) Panesar P, Kennedy J, Knill Ch. Kosseva M. Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey. *Braz. Arch. Biol. Technol* 2010; 53 (1) : 219-226.

(14) Adams M.R, mouse M.A. *Food Microbiology*. As Translator. Mortazavi A, Sadeghi Mahonak A. R. 4th. ed, Mashhad: Mashhad Ferdowsi University Press 1389; p 611.

(15) Rallu F, Gruss A, Ehrlich D, Maguin E. Acid and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals. *Molecular Microbiology* 2000; 35(3): 517-28.

(16) National Standards No. 695 – our features and test methods 1387.

(17) Elizete, D, R.S. C. Biochemical characterization and identification of probiotic *Lactobacillus* for swine. *B.CEPPA. Curitiba* 2005; 23 (2): 299-310.

(18) Sanders J, Venema G, Kok J. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews* 1999; 23: 483-501.

(19) Ahmadi M, Khosrowshahi A, Kashanynzhad M. Isolation and identification of lactic bacterial flora Lighvan traditional cheese. Proceedings of the 18th National Congress of sciences and food industries; 1387 Apl 24-25; Mashhad, Iran.

(20) Hadadji M, Bensoltane A. Growth and lactic acid production by *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in goat's milk. *African J. Biotech* 2006; 5 (6): 505-509.

(21) Yuliana N, Rangga A, Rakhmiati E. Manufacture of fermented coco milk-drink containing lactic acid bacteria cultures. *African J. Food Science* 2010; 4(9): 558-562.

(22) Mehmood T, Masud T, Abbass A, Maqsud Sh. Isolation and Identification of Wild Strains of Lactic Acid Bacteria for Yoghurt Preparation from Indigenous Dahi. *Pakistan J. Nutrition* 2009; 8(6): 886-871.

www.SID.ir

Archive Of SID

(23) Haddadin J. Kinetic Studies and Sensorial Analysis of Lactic Acid Bacteria Isolated from White Cheese Made from Sheep Raw Milk. *Pakistan J. Nutrition* 2005; 4 (2): 78-84.

(24) Vasilean I, Segal R, Vasile A. Obtaining Fermented Dairy Products with The Yogurt Culture YF-L 812. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology* 2011; 35(1): 92-99.

(25) Tomas M, Ocana V, Wiese B, Nader-Macarias M. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med Microbiol* 2003; 52 (12): 1117-24.

(26) Lengkey H, Adriani L. Effects of Milk Fermented With *Lactobacillus acidophilus* And *Bifidobacterium spp* on Lactic Acid and Acetic Acid Content and on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology in Animal Husbandry* 2009; 25(5): 719-724.

[1]. Randox
[2]. Lactic Acid Bacteria
[3]. *Lactobacillus*
[4]. *Pediococcus*
[5]. *Leuconostoc*
[6]. *Lactococcus*
[7]. Orla-jensen
[8]. De Man, Rogosa, Sharpe
[9]. Ibourahema et al.
[10]. Pansar et al.
[11]. Rallu et al.
[12]. Elizete and R.S.
[13]. Adiguzel and Atasever
[14]. Sanders
[15]. Hadadji and Binsoltan.
[16]. Yuliana et al.
[17]. Hoque et al.
[18]. Mehmood et al.
[19]. Haddadin.
[20]. Vasilean et al
[21]. Langkey et al.

www.SID.ir