بررسی ویژگی‌های تکنولوژیکی لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از پنیرهای گوسفندی و گاوی سنتی سنگسر

مریم حسنی [a]*، سید علی مرتضوی [b]، مهدیه حسنی [c]، ندا احمدی کمازانی [d]، معصومه قطبی [e]

[a] عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران
[b] استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، خراسان رضوی، ایران
[c] مدرس گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران
[d] عضو هیئت علمی دانشکده مهندسی صنایع و مکانیک، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران
[e] عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی، واحد چالوس، دانشگاه آزاد اسلامی، چالوس، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۳/۱۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۶/۱۵

چکیده

مقدمه: جنس لاکتوباسیل متعلق به گروه بزرگ باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد. این ارگانیسم‌ها همگی گرم مثبت بوده و بوسیله تخمیر، اسید لاکتیک تولید می‌کنند. از آنجایی که این باکتری‌ها بطور طبیعی در مواد غذایی مختلف وجود دارند از زمان‌های قدیم به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در غذاهای سنتی مورد توجه بوده‌اند.هدف از این تحقیق، بررسی ویژگی‌های تکنولوژیکی و قابلیت استفاده از لاکتوباسیل‌های جدا شده از پنیرهای سنتی گاوی و گوسفندی به عنوان استارتر در پنیر و سایر محصولات تخمیری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق ۱۲ سویه مختلف لاکتوباسیل از ۶ پنیر سنتی تهیه شده از شیر گاو و شیر گوسفند، تولیدی در منطقه سنگسر واقع در استان سمنان جدا گردید. لاکتوباسیل بودن سویه‌ها توسط آزمون‌های فنوتیپی تایید شد. پس از آن سویه‌های جداشده به منظور استفاده به عنوان استارتر توسط آزمون‌های تکنولوژیکی نظیر میزان رشد، تولید اسید، فعالیت پروتئولیتیکی، فعالیت آمیلولیتیکی و فعالیت اتولیتیکی ارزیابی گردیدند.

یافته‌ها: اپتیمم دمای رشد برای همه سویه‌های جداسازی شده $30^{\circ}C$ بود و بیشترین میزان رشد مربوط به ۲ سویه جداسازی شده از پنیر گاوی (LB_{2-5} و LB_{2-1}) بود. فعالیت پروتئولیتیکی در سه سویه جداسازی شده از پنیرهای گاوی (LB_{2-6}، LB_{2-4} و LB_{2-1}) و یک سویه جداسازی شده از پنیرهای گوسفندی (LB_{1-3}) مشاهده شد. در هیچ یک از سویه‌های جداسازی شده فعالیت آمیلولیتیکی دیده نشد و بالاترین میزان تولید اسید و فعالیت اتولیتیکی به ترتیب در یک سویه جداسازی شده از پنیرهای گاوی (LB_{2-2}) و یک سویه جداسازی شده از پنیرهای گوسفندی (LB_{1-1}) مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از پنیر سنتی سنگسر در این مطالعه ویژگی‌های تکنولوژیکی مطلوبی از خود نشان دادند، توانایی بالایی برای استفاده به عنوان استارتر دارند.

واژه‌های کلیدی: *پنیر گوسفندی سنتی سنگسر، پنیر گاوی سنتی سنگسر، فعالیت اتولیتیکی، فعالیت پروتئولیتیکی، لاکتوباسیلوس.*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: mhasani81@yahoo.com

مقدمه

لاکتوباسیل‌ها به عنوان استارتر یا کمک استارتر نقش مهمی درطی تولید و رسانیدن پنیر دارند. عملکرد لاکتوباسیل‌ها به وسیله خصوصیات تکنولوژیکی همچون فعالیت اسیدی، فعالیت پروتئولیتیکی، فعالیت اتولیتیکی، فعالیت لیپولیتیکی وآمیلولیتیکی مشخص می شود (Ayad *et al*., 2004).

اسید لاکتیک تولید شده توسط لاکتوباسیل‌ها عامل ایجاد طعم اسیدی اولیه در پنیر نرسیده می باشد و در تشکیل بافت دلمه وخروج آب پنیر نیز اهمیت دارد (Ma *et al*., 2012). توانایی لاکتوباسیل‌ها در تولید اسید از قند منجر به گسترش ویژگی‌های حسی مطلوب، جلوگیری از رشد میکروب‌های بیماریزا و اطمینان از پایداری و سلامت فرآورده نهایی می‌شود (Kayagil, 2006). همچنین تجزیه لاکتوز و سیترات طی رسیدگی پنیر باعث تولید ترکیبات فرار مانند: استالدهید، اتانول، دی استیل، استون و استوئین می شود که منجر به ایجاد آروما می‌گردد (Psoni *et al*., 2003).

سیستم‌های آنزیمی پروتئولیتیکی لاکتوباسیل‌ها، تجزیه پروتئین‌های شیر به پپتیدها را کاتالیز می‌کنند، سپس پپتیدها به پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه تبدیل می‌شوند. این فرایند در تشکیل طعم در طی رسیدن پنیر نقش مهمی دارد (Guven *et al*., 2006). ترکیبات طعمی اصلی تولید شده طی لیپولیز، اسیدهای چرب آزاد هستند که مستقیما بر طعم پنیر اثر دارند (Holland *et al*., 2005). عملکرد اصلی باکتری‌های اسید لاکتیک کاهش سریع pH می‌باشد که این امر فوایدی را نیز به دنبال دارد، از جمله: سلامت محصول از طریق غیر فعال نمودن پاتوژن‌ها، بهبود ویژگی‌های حسی محصول از طریق اصلاح شرایط بیوشیمیایی واکنش‌های رسیدن و افزایش ثبات و ماندگاری محصول (Essid *et al*., 2009).

بنابراین، تمام خصوصیات فوق الذکر لاکتوباسیل‌ها جهت استفاده از آنها به عنوان استارتر و کمک استارتر در تولید پنیر مهم بوده و جهت انتخاب بهترین سویه مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. امروزه به بررسی پتانسیل میکروارگانسیم‌های بومی موجود در فرآورده‌های سنتی حاصل از شیر خام توجه ویژه‌ای میگردد، تا از این طریق بتوان محصولاتی با تنوع عطر و طعم بالا و بازارپسندی بیشتر تولید کرد. بنابراین آگاهی از ترکیب فلور لاکتیکی طبیعی پنیرهای سنتی، امکان تهیه استارتری به منظور تولید محصولی سالم و استاندارد با حفظ خصوصیات اساسی فرآورده را فراهم می‌آورد. به طوریکه نتایج حاصل از تلاش‌های محققان مختلف نشان دهنده این واقعیت است که سویه‌های وحشی، تولید عطر و طعم بهتری نسبت به انواع صنعتی دارند. این میکروارگانیسم‌ها در مقادیر معین و با تلفیق مقادیر مناسبی از سویه‌های مختلف عطر و آرومای مطلوب و مورد نظر را تولید می‌کنند (نوید قاسمی‌زاد، ۱۳۸۳). از لحاظ تاریخی، ایران قدمت طولانی در تولید انواع مختلفی از محصولات لبنی تخمیری دارد که پنیرهای تولیدی سنگسر یکی از آن جمله است. این پنیر با توجه به عطر و طعم مطلوب از بازارپسندی بالایی در استان سمنان برخوردار است. هدف از این تحقیق، بررسی ویژگی‌های تکنولوژیکی و قابلیت استفاده از لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از پنیرهای سنتی گاوی و گوسفندی به عنوان استارتر یا کمک استارتر در پنیر و دیگر محصولات تخمیری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

محیطهای کشت MRS-Agar و MRS-Broth از شرکت Liofilchem، محیطهای Simmons citrate agars و MR-VP از شرکت Merck و مواد شیمیایی از شرکت Sigma- Aldrich تهیه شدند.

۶ نمونه پنیر سنتی سنگسر (۳ نمونه پنیر گوسفندی و ۳ نمونه پنیر گاوی) از کارگاه پنیر سازی شهرستان مهدی شهر (سنگسر) واقع در استان سمنان تهیه گردید. هر ۶ نمونه پنیر محصول تولیدی یک کارگاه در روزهای متفاوت بودند. بسته‌های پنیر در شرایط دمایی ۴°C تا روز نمونه برداری نگهداری شدند.

- ایزولاسیون و شناسایی جدایه‌های باکتریایی با استفاده از روش‌های فنوتیپی

۲۵ گرم از هر نمونه تحت شرایط استریل درون ۲۲۵ میلی لیتر محلول استریل سیترات سدیم ۲٪ وزنی/ حجمی در دمای ۴۵°C توسط دستگاه استو میکر (Seward) مدل ۴۰۰ مخلوط گردید و رقت‌های اعشاری 10^{-5}،10^{-4}،10^{-3} و 10^{-2}در آب پپتونه استریل۰/۱٪ وزنی/ حجمی تهیه شد

(Bell *et al*., 2005).

۰/۱ میلی لیتر از هر رقت بر سطح محیط MRS-Agar (جهت ایزولاسیون لاکتوباسیل‌ها) تزریق شده و کشت سطحی داده شد و در دمای ۳۰°C به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

پس از سپری شدن مدت گرمخانه‌گذاری، از پلیت‌های دارای بالاترین رقت ۴ تا ۵ کلونی که از نظر شکل، رنگ و اندازه متفاوت بودند، برداشته شد و جهت خالص سازی بیشتر ۲ تا ۳ بار بر روی همان محیط‌های کشت قبلی کشت خطی مجدد داده شد (Suzzi *et al*., 2000).

ابتدا بر روی هر کلونی خالص به دست آمده، آزمون رنگ‌آمیزی گرم (Bell *et al*., 2005) و تست کاتالاز (Fox *et al*., 2000) صورت گرفت. پس از اطمینان از گرم مثبت و کاتالاز منفی بودن کلونی، خصوصیات مورفولوژی سلول در زیر میکروسکوپ بررسی شد و باسیل یا کوکسی بودن آن تایید گردید (Fox *et al*., 2000). همچنین تست تولید گاز (Bell *et al*., 2005) و تجزیه سیترات در محیط Simmons citrate agars و آزمون وگوس- پروسکوئر در محیط MR-VP به عنوان تست تاییدی صورت گرفت (عدالتیان و همکاران،۱۳۹۰).

- بررسی خصوصیات تکنولوژیکی

- اپتیمم دمای رشد

باکتری‌هایی که در محیط MRS Broth تلقیح شده بودند، در دماهای ۲۵،۳۰ و ۴۳ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، optical density در ۶۵۰ نانومترتوسط اسپکتروفتومتر(Jenway مدل6800) اندازه گیری شد (Ma *et al*., 2012).

- تعیین فعالیت اسیدی

سویه‌های باکتری‌های جدا شده که ۲۴ ساعت قبل از آزمون در محیط MRS مایع جوان شده بودند به میزان ۱٪ حجمی/ حجمی به محیط شیر بدون چربی بازساخته ۱۰٪ وزنی/ حجمی استریل، تلقیح شده و در دمای۳۰°C گرمخانه‌گذاری گردید. برای انجام این آزمون ابتدا pH محیط شیر بدون چربی باز ساخته تلقیح شده در زمان‌های ۰، ۶ ، ۲۴ و ۲۹ ساعت با استفاده از pH متر (GP353) اندازه‌گیری شد. مقادیرتغییرات pH به صورت زیر محاسبه گردید.

$$\Delta pH = pH_{\text{at time}} - pH_{\text{zero time}}$$

سپس به منظور تعیین میزان اسید تولیدی فالکون‌های حاوی شیر و باکتری پس از گذشت زمان‌های ذکر شده با NaOH ۰/۱ مولار تیتر شدند (Ma *et al*., 2012; Piraino *et al*., 2008).

- تعیین فعالیت پروتئولیتیکی

تعیین فعالیت پروتئازی به روش کیفی صورت گرفت. به این منظور باکتری‌های لاکتوباسیل جداسازی شده بر روی پلیت حاوی محیط شیر بدون چربی بازساخته ۱۰ ٪ آگاردار کشت شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه گرمخانه‌گذاری گردیدند. کلنی‌هایی که اطراف آنها هاله شفاف تشکیل شد به عنوان سویه‌های دارای فعالیت پروتئازی در نظر گرفته شدند (Omafuvbe *et al*., 2011; Thapa *et al*., 2006).

- تعیین فعالیت اتولیتیکی

اتولیز شدن باکتری‌ها در بافر سیترات سدیم (۵/۵ :mM, pH ۵۰) و کلرید سدیم ۰/۵M اندازه‌گیری شد. به این منظور ۱ میلی‌لیتر از محیط حاوی هر نمونه به میکروتیوب‌های استریل منتقل گردید. میکروتیوب‌ها در ۱۲۶۰۰g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C توسط سانتریفوژ (HERMLE مدلZ323K) دو فاز شدند. مایع رویی هر تیوب خارج گردید و رسوب باکتریایی باقیمانده در ته هر میکروتیوپ ۲ بار با محلول کلرید سدیم ۰/۸۵٪ وزنی/ حجمی استریل شستشو داده شد. سپس توده‌های باکتریایی باقیمانده در هر میکروتیوپ با ۱۰ میلی لیتر از بافر اتولیز کننده نیمه گرم مخلوط شدند.

OD_{650} پیش از گرمخانه‌گذاری اندازه‌گیری و به عنوان OD_0 در نظر گرفته شد.

سپس میکروتیوپ‌ها در دمای ۴۰°C گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از مدت ۲۴ ساعت مجدداً OD آنها درطول موج ۶۵۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Ma *et al*., 2012; Piraino *et al*., 2008).

اتولیز بر حسب سطوح فعالیت هر جنس مطابق با روش (Hassaïne *et al*., 2007) طبقه‌بندی شد که برای لاکتوباسیل‌ها بدین صورت می‌باشد. ۹۶ –۷۰ خوب، ۶۹– ۴۰ متوسط و ۳۹–۰ ضعیف.

- تعیین فعالیت آمیلولیتیکی

باکتری‌های لاکتوباسیل جداسازی شده بر روی پلیت حاوی نشاسته آگاردار کشت شدند و به مدت ۴ روز در دمای ۳۰°C گرمخانه‌گذاری شدند. پلیت‌ها با محلول ید برای ۳۰–۱۵ دقیقه پوشانده شدند و کلنی‌هایی که اطراف آنها هاله شفاف تشکیل شد به عنوان سویه‌های دارای فعالیت آمیلولیتیکی در نظر گرفته شدند (Omafuvbe *et al*., 2011; Thapa *et al*., 2006).

- تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت و از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد برای مقایسه میانگین تیمارها استفاده شد. تمامی آزمایشات در ۳ تکرار انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SPSS 16 و رسم نمودارها توسط نرم افزارExcel انجام شد.

یافته‌ها

مقادیر OD_{650} محیط کشت تلقیح شده بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دماهای مختلف، جهت تعیین بهترین دمای رشد سویه‌های لاکتوباسیلوس در جدول ۱ مقایسه شده است.

همه لاکتوباسیل‌ها در تمامی دماهای مورد آزمایش رشد کردند. اپتیمم رشد برای همه سویه‌های باکتری در دمای ۳۰°C مشاهده گردید، به استثنا سویه L.B $_{2-3}$ جدا شده از پنیر گاوی که در دمای ۲۵°C بیشترین رشد را نشان داد. کمترین میزان رشد برای همه نمونه‌ها در دمای ۴۳°C ثبت گردید. میانگین میزان رشد در دمای ۳۰°C برای لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از پنیر گاوی به شکل معنی‌داری ($p< ۰/۰۵$) بالاتر از میانگین میزان رشد سویه‌ها در همان دما برای باکتری‌های جدا شده از پنیر گوسفندی بود. همچنین در میزان رشد لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از پنیرهای گاوی و گوسفندی به صورت جدا گانه نیز، در دماهای مورد بررسی اختلاف معنی‌داری ($p< ۰/۰۵$) دیده شد.

جدول ۱- مقادیر OD_{650} محیط کشت تلقیح شده بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون در دماهای مختلف

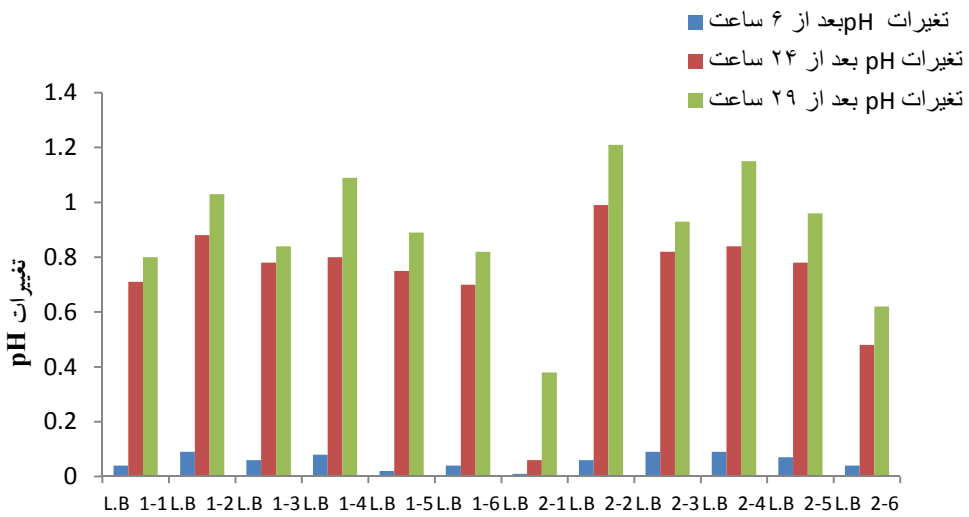
نمونه	۲۵ درجه سانتی‌گراد	۳۰ درجه سانتی‌گراد	٤۳ درجه سانتی‌گراد
L.B $_{1-1}$	۰/ ۰۶۴۵ ^{i}	۰/۲۴۴۳ ^{j}	۰/۰۰۳۵ ^{k}
L.B $_{1-2}$	۰/۰۶۶۸ ^{h}	۰/۲۴۴۷ ^{j}	۰/۰۱۹۰ ^{f}
L.B $_{1-3}$	۰/۰۵۸۱ ^{k}	۰/۲۸۷۵ ^{g}	۰/۰۱۲۵ ^{i}
L.B $_{1-4}$	۰/۰۶۲۲ ^{j}	۰/۲۴۱۰ ^{k}	۰/۰۱۷۲ ^{g}
L.B $_{1-5}$	۰/۰۴۶۵ ^{l}	۰/۲۵۱۸ ^{i}	۰/۰۰۴۸ ^{j}
L.B $_{1-6}$	۰/۰۶۷۵ ^{g}	۰/۲۶۲۵ ^{h}	۰/۰۱۴۳ ^{h}
L.B $_{2-1}$	۰/۶۰۵۳ ^{a}	۱/۰۰۷۲ ^{a}	۰/۱۵۵۲ ^{a}
L.B $_{2-2}$	۰/۲۳۸۷ ^{f}	۰/۳۲۶۱ ^{e}	۰/۰۴۲۵ ^{cd}
L.B $_{2-3}$	۰/۵۹۹۰ ^{b}	۰/۳۵۱۵ ^{d}	۰/۰۴۳۳ ^{c}
L.B $_{2-4}$	۰/۲۴۲۵ ^{e}	۰/۳۸۱۷ ^{c}	۰/۰۳۶۸ ^{e}
L.B $_{2-5}$	۰/۴۰۲۱ ^{c}	۰/۴۲۵۸ ^{b}	۰/۱۲۸۴ ^{b}
L.B $_{2-6}$	۰/۲۸۷۰ ^{d}	۰/۳۱۲۲ ^{f}	۰/۰۴۱۸ ^{d}

L.B$_{1-1}$: لاکتوباسیل‌های جدا شده از پنیرگوسفندی

L.B$_{2-1}$: لاکتوباسیل‌های جدا شده از پنیرگاوی

لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از پنیرهای سنتی توانایی‌های متفاوتی را برای کاهش pH نشان دادند. تغییر pH در تمامی نمونه‌ها پس از ۶ ساعت ناچیز بود. دامنه تغییرات pH پس از ۲۹ ساعت در نمونه‌های شیر تلقیح شده با لاکتوباسیل‌های جدا شده از پنیر گوسفندی از ۰/۸ تا ۱/۰۹ و در نمونه‌های شیر تلقیح شده با لاکتوباسیل‌های جدا شده از پنیر گاوی از ۰/۳۸ تا ۱/۲۱ متغیر بود. درهمه نمونه‌ها بعد از گذشت ۶ ساعت بیش از ۰/۱ درصد اسید تولید نشده است، نتایج در جدول ۲ ارائه شده است. بیشترین تغییرات pH مربوط به $L.B_{2-2}$ بعد از گذشت ۲۹ ساعت است و مقایسه تغییرات pH در نمونه شیر بدون چربی بعد ازگذشت ۶، ۲۴ و ۲۹ ساعت در نمودار ۱ انجام شده است.

میزان تولید اسید برای سویه‌های جداسازی در زمان‌های ۶، ۲۴ و ۲۹ ساعت در جدول ۲ آمده است. اکثر سویه‌های جداسازی شده پس از ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری از نظر میزان تولید اسید نسبت به ۶ ساعت اول رشد نشان دادند و از نظر میزان تولید اسید در اکثر سویه‌ها اختلاف معنی‌داری بین ۲۴ ساعت رشد و ۲۹ ساعت رشد مشاهده نگردید.



نمودار ۱- تغییرات pH در نمونه شیر بدون چربی بعد از ٦، ٢٤ و ٢٩ ساعت

جدول ۲- نتایج آزمون اندازه گیری اسیدیته نمونه شیر بدون چربی بعد از ٦، ٢٤ و ٢٩ ساعت

لاکتوباسیل‌های جدا شده از پنیر گوسفندی و گاوی	زمان ٦ ساعت	زمان ٢٤ ساعت	زمان ٢٩ ساعت
	اسیدیته	اسیدیته	اسیدیته
$L.B_{1-1}$	۰/۲۳±۰/۰۱۷ a	۰/۳۱± ۰/۰۰۶ a	۰/۳۲± ۰/۰۰۸ cd
$L.B_{1-2}$	۰/۲۵± ۰/۰۲۸ a	۰/۳۲± ۰/۰۱۱ a	۰/۳۴± ۰/۰۱۱ bcd
$L.B_{1-3}$	۰/۲۴± ۰/۰۲۳ a	۰/۳۱± ۰/۰۱۱ a	۰/۲۳± ۰/۰۱۱ cde
$L.B_{1-4}$	۰/۲۵± ۰/۰۱۷ a	۰/۳۲± ۰/۰۱۳ a	۰/۳۶± ۰/۰۱۷ abc
$L.B_{1-5}$	۰/۲۳± ۰/۰۱۱ a	۰/۳± ۰/۰۰۶ ab	۰/۳۲± ۰/۰۱۵ cde
$L.B_{1-6}$	۰/۲۳± ۰/۰۲۳ a	۰/۲۹± ۰/۰۰۵ ab	۰/۳۱± ۰/۰۰۶ def
$L.B_{2-1}$	۰/۲۳± ۰/۰۰۵ a	۰/۲۵± ۰/۰۱۱ c	۰/۲۷± ۰/۰۰۵ f
$L.B_{2-2}$	۰/۲۳± ۰/۰۱۱ a	۰/۳۲± ۰/۰۱۷ a	۰/۴± ۰/۰۲۸ a
$L.B_{2-3}$	۰/۲۵± ۰/۰۰۵ a	۰/۳± ۰/۰۱۲ ab	۰/۳۶± ۰/۰۱۱ abc
$L.B_{2-4}$	۰/۲۶± ۰/۰۰۷ a	۰/۳± ۰/۰۰۵ ab	۰/۳۸± ۰/۰۱۷ ab
$L.B_{2-5}$	۰/۲۴± ۰/۰۱۲ a	۰/۲۹± ۰/۰۱۱ ab	۰/۳۲± ۰/۰۱۵ cde
$L.B_{2-6}$	۰/۲۳± ۰/۰۰۵ a	۰/۲۷± ۰/۰۱۴ bc	۰/۲۸±۰/۰۱۲ ef

اسیدیته بر حسب اسید لاکتیک در ۱۰۰ گرم نمونه می باشد

سویه‌های شناسایی شده در این تحقیق فعالیت‌های پروتئازی متفاوتی نشان دادند. در این بین،۳ سویه دارای بیشترین فعالیت پروتئازی بودند، سویه‌هایی که بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی را نشان دادند لزوما دارای بیشترین فعالیت اسیدی نمی باشند. در جدول ۳ فعالیت پروتئولیتیکی سویه‌ها مشخص شده است. در تحقیقات انجام شده نیز ارتباط معنی‌داری بین فعالیت اسیدی و پروتئولیتیکی یافت نشده است (Grabal *et al*., 2008; Durlu-Ozkaya *et al*., 2001).

در هیچکدام از نمونه‌های لاکتوباسیل مورد بررسی فعالیت آمیلولیتیکی مشاهده نگردید (جدول ۳).

فعالیت اتولیتیکی سویه‌ها در نمودار ۲ نشان داده شده است. بیشترین فعالیت اتولیتیکی در بین نمونه ها مربوط به لاکتوباسیل جداشده از پنیر گوسفندی($L.B_{1-1}$) بود و بعد از آن لاکتوباسیل‌های جدا شده از پنیر گاوی ($L.B_{2-1}$ و $L.B_{2-2}$) بیشترین میزان اتولیز را داشتند.

بحث

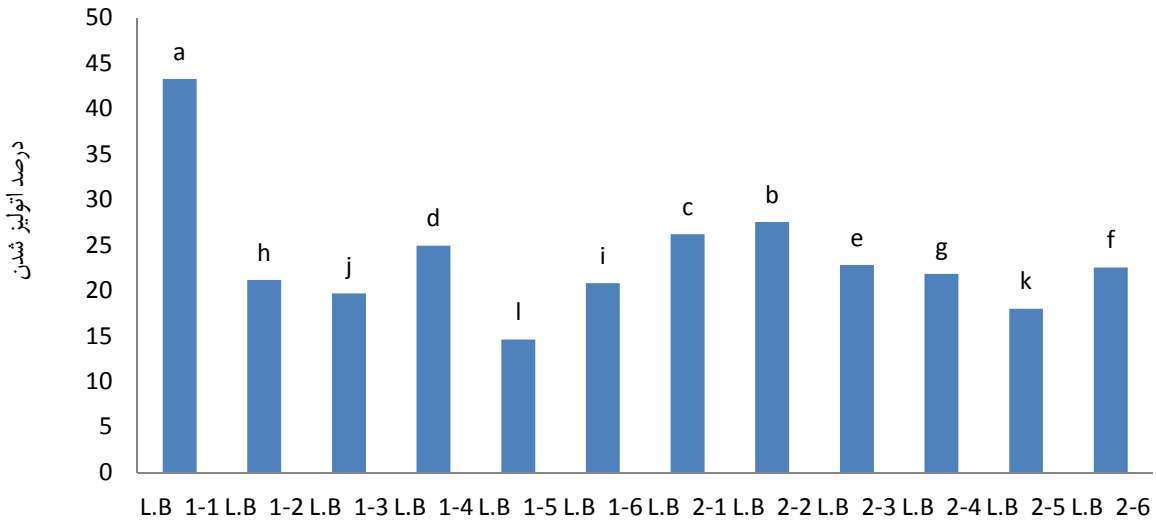
پنیر تهیه شده از شیر پاستوریزه دارای کیفیت بهداشتی بهتر و بافت یکنواخت‌تر است، اما پاستوریزاسیون اثرات مخرب بر طعم دارد. چرا که تعدادی از میکروب‌هایی که مسئول توسعه طعم پنیر هستند، به وسیله پاستوریزاسیون حذف خواهند شد. راه حل این مشکل در تولید فرآورده با استفاده از شیر پاستوریزه، استفاده از استارتر بومی آن بعد از فرآیند پاستوریزاسیون می‌باشد. لاکتوباسیلوس‌ها به عنوان گونه‌های غالب در پنیرهای تهیه شده با شیرخام گزارش شده‌اند، زیرا این ارگانیسم‌ها قادر به رشد تحت شرایط انتخابی شدید نیز می‌باشند (Torres-Llanez *et al*., 2006).

بهترین میزان رشد در همه دماهای مورد آزمایش مربوط به سویه $L.B_{2-1}$ جداسازی شده از پنیر گاوی بود. این نتایج می تواند به دلیل آب و هوای مناطق جمع آوری نمونه‌های شیر باشد (Ma *et al*., 2012).

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 (Kayagil, 2006).

جدول ۳- فعالیت پروتئولیتیکی و آمیلولیتیکی سویه‌ها

نوع سویه	L.B 1-1	L.B 1-2	L.B 1-3	L.B 1-4	L.B 1-5	L.B 1-6	L.B 2-1	L.B 2-2	L.B 2-3	L.B 2-4	L.B 2-5	L.B 2-6
فعالیت پروتئولیتیکی	–	–	–	–	–	+	+	–	–	+	–	+
فعالیت آمیلولیتیکی	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–



نمودار ۲- فعالیت اتولیتیکی سویه ها

کاهش سریع در میزان pH در اولین مرحله تولید پنیر بسیار با اهمیت می‌باشد، زیرا آن جهت انعقاد و جلوگیری یا کاهش رشد فلور میکروبی نامناسب ضروری است (Ma *et al*., 2012).

در حقیقت، فعالیت اسیدی هر گونه مرتبط با ظرفیت ویژه‌اش برای شکستن و جذب مواد غذایی موجود در محیط است، البته ممکن است تفاوت‌هایی به علت حضور یا عدم حضور سیستم‌های انتقال نیز ایجاد شود (Badis *et al*., 2004).

Dagdemir و Ozdemir در سال ۲۰۰۸ گزارش نمودند لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از پنیر سفید ترش ترکیه‌ای طی ۶ ساعت گرمخانه گذاری با سرعت کمی اسید تولید کردند که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت داشت. همچنین Ma و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیان کردند تغییرات pH ایجاد شده توسط لاکتوباسیلهای جداسازی شده از شیرهای تخمیری سنتی چین طی ۶ ساعت بسیار پایین بود و دامنه تغییرات از ۰/۰۴ تا ۰/۶۵ بود.

پروتئولیز مهم‌ترین وپیچیده ترین واکنشی است که در طول رسیدن اتفاق می‌افتد که توسط آنزیم‌های شیر (عمدتا پلاسمین)، رنین (پپسین و کیموزین) و آنزیم‌های آزاد شده از باکتری‌های آغازگر و میکروفلور ثانوی انجام می‌گیرد (Sousa *et al*., 2001).

فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک لبنی جهت رشد میکروبی در شیر ضروری است و باعث توسعه خواص ارگانولپتیکی محصولات لبنی تخمیری می‌شود. تولید محصولات لبنی تخمیری با کیفیت بالا وابسته به فعالیت پروتئولیتیکی باکتریهای استارتری است، زیرا پپتیداز و اسیدهای آمینه تشکیل شده اثر مستقیم بر طعم یا حفظ پیش‌سازهای طعم در این محصولات دارد (Hassaine *et al*., 2007).

Dako و همکاران در سال ۱۹۹۵نشان دادند که فعالیت پروتئازی لاکتوباسیل‌ها از لاکتوکوکسی‌ها بیشتر است. Ma و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز با بررسی فعالیت پروتئولیتیکی لاکتوباسیلهای جدا شده ازشیرهای تخمیری بیان نمودند گونه‌های لاکتوباسیلوس دارای توانایی متفاوتی در فعالیت پروتئولیتیکی هستند وسویه‌هایی با بالاترین فعالیت پروتئولیتیکی عموماً میزان pH را نیز به شکل قابل توجهی کاهش دادند.

درصد اتولیز در بین نمونه‌ها مابین ۱۴/۶۲و۴۳/۲۸ درصد است که این نتایج مطابق با نتایج (Piraino *et al*., 2008) می‌باشد. با توجه به نتایج، سویه‌های جداسازی شده از نظر فعالیت اتولیتیکی در محدوده ضعیف تا متوسط قرار دارند.

توانایی لیز شدن گونه‌ها و پس از آن خروج آنزیم‌های درون سلولی یک ویژگی مطلوب در طی رسیدن پنیر است (Ayad *et al*., 2004). که به دلیل افزایش در اسیدهای آمینه آزاد و کاهش در تلخی از طریق هیدرولیز پپتیدهای بزرگ هیدروفوب می باشد و یکی از راه‌های موثر در تسریع رسیدگی پنیر افزودن سوش‌هایی با فعالیت اتولیتیکی بالاست (Ma *et al*., 2012). درجه اتولیز شدن باکتری‌ها به گونه آنها وابسته است (Ayad *et al*., 2004). آنزیم‌های خارج شده طی لیز شدن نقش کلیدی درتشکیل اسیدهای آمینه مولد ترکیبات طعم زا دارند و این دسته از گونه‌ها برای بهبود طعم در تولید محصولات لبنی تخمیری مورد توجه هستند (Lortal *et al*., 2005). 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 (Hannon *et al*., 2002)

نتایج بدست آمده در خصوص فعالیت آمیلولیتیکی در این تحقیق، مطابق با نتایج Omafuvbe و همکاران در سال ۲۰۱۱ می‌باشد. با اینکه هیچ سوش باکتری اسید لاکتیک تولید کننده آمیلاز در محصولات لبنی گزارش نشده است، سوش‌های محدودی از باکتری‌های لاکتیکی تولید کننده آمیلاز در محصولات کاساوا و ذرت تخمیرشده آفریقایی مشاهده شده است (Omafuvbe *et al*., 2011).

نتیجه‌گیری

سویه‌های لاکتوباسیل جدا شده از پنیرهای سنتی سنگسر ویژگی‌های تکنولوژیکی متنوعی از خود نشان دادند. ایزوله‌هایی با ویژگی‌های تکنولوژیکی مناسب مثل سویه LB_{1-1} با بیشترین فعالیت اتولیتیکی، سویه‌های LB_{2-5} و LB_{2-1} با بیشترین میزان رشد در ۳۰ درجه، سویه‌های

LB_{2-6}، LB_{2-4}، LB_{2-1} و LB_{1-3} با فعالیت پروتئولیتیکی و سویه‌های LB_{2-4}، LB_{2-2}، LB_{1-2}، LB_{1-4} با بالاترین فعالیت اسیدی، پتانسیل بالایی برای کاربردهای عملی نظیر استفاده به عنوان استارتر یا کمک استارتر در پنیر و سایر محصولات تخمیری دارند. همچنین سویه LB_{2-4} با فعالیت‌های پروتئولیتیکی مطلوب و فعالیت اسیدی بالا علاوه بر استفاده به عنوان استارتر یا کمک استارتر می‌تواند جهت طراحی گونه‌های تغییر یافته ژنتیکی با ویژگی‌های مورد نظر نیز استفاده شود. در مجموع می توان بیان نمود در مقایسه بین سویه‌های جدا شده از دو پنیر مختلف گاوی و گوسفندی، سویه‌های جداسازی شده از پنیر گاوی به استثنای ویژگی اتولیتیکی، در مورد سایر ویژگی‌های مورد بررسی خصوصیات مطلوب‌تری نشان دادند.

منابع

عدالتیان، م. ر.، حبیبی نجفی، م. ب.، مرتضوی، س. ع.، نصیری، م. ر.، باسامی، م. ر. و هاشمی، س. م. و (۱۳۹۱). جداسازی و شناسایی فلور لاکتیکی پنیر لیقوان از تولید تا رسیدن. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، صفحات ۲۱-۹.

نوید قاسمی‌زاد، س. (۱۳۸۳). شناسایی باکتری‌های لاکتیک در پنیر سنتی لیقوان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

Ayad, E. H. E., Nashat, S., EL-Sadek, N., Metwaly, H. & 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 Microbiology, 21, 715-725.

Badis, A., Guetarri, D., Boudjema, B. M., Henni, D. E. & Kihal, M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. Food Microbiology, 21, 579-588.

Bell, C., Neaves, P. & Williams, A. P. (2005). Food microbiology and laboratory practice. Blackwell Publishing.

Dako, E., El-Soda, M., Vuillemard, J. C. & Simard, R. E. (1995). Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria. Food Research International, 28, 503-509.

Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N. & 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.

Essid, I., Medini, M. & Hassouna, M. (2009). Technological and safety properties of Lactobacillus plantarum strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. Meat Science , 81, 203- 208.

Fox, P. F., Guinee, T. P. & McSweeney, P. L. H. (2000). Fundamental of cheese science. Aspen Publisher, Inc., Gaithersburg.

Garabal, I. J., Rodriguez-Alonso, P. & Centavo, J. A. (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, 1452-1458.

Guven, M., Yerlikaya, S. & Hayaloglu, A. (2006). Influence of salt concentration on the characteristics of Beyaz cheese, a Turkish White-brined cheese. INRA. EDP Science, 86, 73-81.

Hannon, J. A., Wilkinson, M. G., Delahunty, C. M., Wallace, J. M., Morrissey, P. A & Beresford, T. P. (2002). Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. International Dairy Journal, 13, 313-323.

Hassaïne, O., Zadi-Karam, H. & Karam, N. E. (2007). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian romedary (*Camelus dromedarius*). African Journal of Biotechnology, 6 (14), 1720-1727.

Holland, R., Liu, S. Q., Crow, V. L. Delabre, M. L., Lubbers, M., Bennlt, M. & Norris, G. (2005). Esterases of lactic acid bacteria an cheese flavour: milk fat hydrolysis, alcolyis and esterification. Internatinal Dairy Journal, 15, 711-718.

Kayagil, F. (2006). Effect of traditional starter cultures on quality of cheese. phD. thesis Graduate School of Atural and Applied Sciences of Middle East Technical University.

Lortal, S. & Chapot-Chartier, M. P. (2005). Role, mechanisms and contral of lactic cid bacteria lysis in cheese. International Dairy Journal, 15, 857-871.

Ma, CH., Zhang, L., Ma, D., Du, M., Han, X., Yi, H., Zhang, L., Feng, Z., Zhang, Y., Zhang, Y. & Song, W. (2011). Technological characterisation of Lactobacilli isolated from Chinese artisanal fermented milks. International Journal of Dairy Technology, 65, 132-139.

Omafuvbe, B. O. & Enyioha, L. C. (2011). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from selected commercial Nigerian bottled yoghurt. African Journal of Food Science, 5(6), 340 – 348.

Piraino, P., Zotta, T., Ricciardi, A., McSweeny, P. L. H. & 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.

Psoni, L., Tzanetakis, N. & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2003). Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. Food Microbiology, 20, 575-582.

Sousa, M. J., Ardo, Y., McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. International Dairy Journal, 11, 327-345.

Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M. E., Andrighetto, C. & Lanorte, M. T. (2000). A survey of entrococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (Semicotto Caprina). Journal of Applied Microbiology, 89, 267-274.

Thapa, N., Pal, J. & Tamang, J. P. (2006). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. International Journal of Food Microbiology, 107, 33- 38.

Torres-Llanez, M. J., Vallejo-Cordoba, B., Diaz-Cinco, M. E., Mazorra-Manzano, M. A. & Gonzalez-Cordova, A. F. (2006). Characterization of the natural microfolora of arltisanal Maxican Fersco cheese. Food Control, 17, 683-690.