جداسازی و تعیین ویژگی‌های تکنولوژیکی لاکتوباسیل‌های پنیر سنتی مراغه

امید میرزایی تاش[1*]، محمدعلی شب خیز[2]

۱. گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، واحد ممقان، دانشگاه آزاد اسلامی، ممقان، ایران.
۲. دانش آموخته دکترای علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، هنرآموز صنایع غذایی هنرستان کشاورزی، مراغه، ایران.

***نویسنده مسئول:** *Aradtech.group@yahoo.com*

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۷/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷

چکیده

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی در مقادیر مناسب در دستگاه گوارشی وجود داشته باشند، تاثیرات سودمندی بر میزبان برجای می‌گذارند. از میان باکتری‌های پروبیوتیک، لاکتوباسیل‌ها متداول‌ترین نوع باکتری‌هایی هستند که در محصولات لبنی وجود داشته و در طول مراحل تخمیر، اسید لاکتیک تولید می‌کنند. هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی لاکتوباسیل‌ها، از فلور موجود در پنیر سنتی مراغه و تعیین ویژگی‌های تکنولوژیکی، فعالیت لیپولیتیکی و پروتئولیتیکی آن‌ها بود. برای این منظور، باکتری‌های لاکتیکی توسط روش‌های متداول کشت و شناسایی بر اساس خواص بیوشیمیایی جداسازی شدند و سپس آزمایشات تکمیلی، به منظور شناسایی کامل ایزوله‌های موجود، از جمله رنگ‌آمیزی گرم، آزمون اکسیداز، کاتالاز و PCR انجام شد. در ادامه قدرت تولید اسید، تغییرات pH توسط جدایه‌های لاکتوباسیلوس طی زمان‌های مختلف و بهترین دما برای رشد این سویه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد در همه نمونه‌ها اسیدیته با گذشت زمان افزایش و pH کاهش پیدا کرد. اسیدیته در تمامی نمونه‌ها و در دماهای ۳۰، ۳۷، ۴۲ و ۴۵ درجه سلسیوس طی زمان‌های صفر، ۴، ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت افزایش پیدا کرد و در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت در چند نمونه روند کاهشی مشاهده گردید. همچنین pH در تمامی نمونه‌ها و در دماهای مذکور تا ۴۸ ساعت، کاهش منظم و محسوسی داشت و در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت در اکثر نمونه‌ها و دماها، مقدار ثابت بود.

کلید واژه ها: لاکتوباسیلوس، PCR، پنیرسنتی مراغه.

مقدمه

یکی از محصولات لبنی تخمیری مهم در سطح جهانی پنیر است. در این راستا پنیرهای سنتی به شکل گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. پنیرهای تولیدی به روش صنعتی طعم پنیرهای سنتی را ندارند یا برخی از ویژگی‌های حسی-شان بسیار ضعیف است.

که این امر با پاستوریزاسیون شیر و استفاده از استارترهای تجاری مشخص در ساخت پنیرهای صنعتی مرتبط است. پنیرهای تولید شده از شیرخام به روش سنتی پروفایل‌های طعمی گسترده‌تر و محسوس‌تری را نشان می‌دهند و خصوصیات ویژه این پنیرها ظاهراً نتیجه‌ای از تنوع جنس‌ها و گونه‌های محلی و فلور میکروبی ویژه شیر است. بنابراین آگاهی از ترکیب فلور لاکتیکی طبیعی پنیرهای سنتی امکان تهیه استارتر به منظور تهیه محصولی سالم و استاندارد با حفظ ویژگی‌های اساسی فراورده را فراهم می-آورد (Tavaria, et al., 2003; Durlu-Ozakaya, et al., 2001; Garabal, et al., 2007). پنیر سنتی مراغه یک پنیر نرم (با حدود ۶۰ درصد رطوبت) می‌باشد که به طور سنتی و معمولاً از شیر میش و گاهی از شیر بز، شیر گاو و یا ترکیبی از آن‌ها تهیه می‌شود. این پنیر دارای طعم نمکی و شور، کمی اسیدی و دارای خصوصیات مطبوع ارگانولپتیکی بوده و از نظر خواص حسی شبیه پنیر سفید ترکیه (Beyaz penir) و پنیر فتا (Feta) می‌باشد.

خصوصیات ارگانولپتیکی و کیفی پنیر نظیر بافت، بو، عطر و... به عوامل مختلفی از جمله به نوع شیر مصرفی، کیفیت میکروبی آن، فرایند و شرایط رسیدن آن بستگی دارد. اسید لاکتیک تولیدی توسط باکتری‌ها نقش اساسی در آزاد کردن ترکیبات مسئول در توسعه طعم پنیر ایفا می‌کنند (Herreros, et al., 2003; Charles, et al.,1997).

باکتری‌های پروبیوتیک به عنوان عوامل زنده میکروبی تعریف می‌شوند که با قرار گرفتن در محیط روده می‌توانند تعادل میکروبی را در جهت افزایش سودمندی آن‌ها اصلاح کنند و با فعالیت خود مانع از فعالیت میکروارگانیسم‌های غیرمفید و بیماری‌زا می‌شوند از میان باکتری‌های پروبیوتیک، باکترهای تولیدکننده اسیدلاکتیک، متداول‌ترین باکتری‌هایی هستند که در محصولات لبنی وجود داشته و در طی مراحل تخمیر، اسیدلاکتیک تولید می‌کنند (Klaenhammer, 2000; Parsaeimehr, et al., 2019).

جنس لاکتوباسیلوس اولین‌بار توسط بیرجینگ توصیف شده است که شامل ۶۰ گونه و زیرگونه می‌باشد (Ayele, et al., 2001). لاکتوباسیلوس‌ها به دلیل توانایی‌شان در تخمیر و نیز اهمیت‌شان در سلامتی انسان به عنوان پروبیوتیک‌ها مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. آن‌ها ترکیباتی مانند اسیدهای آلی، دی‌استیل، پراکسید هیدروژن و نیز باکتریوسین‌ها را در طی تخمیر لاکتیکی تولید می‌کنند که اثر حفاظتی آن‌ها در موادغذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. برای شناسایی دقیق‌تر پروبیوتیک‌ها، علاوه بر شناسایی بیوشیمیایی، استفاده از ژن ۱۶S rRNA و توالی‌یابی در شناسایی مولکولی توسط واکنش PCR انجام شده است (Çakır, 2003; Demirci, et al, 2021). در ایران مطالعاتی در زمینه جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک صورت گرفته است. امروزه سویه‌های جدید باکتری‌های لاکتیکی که سویه‌های وحشی نامیده می‌شوند، از انواع محصولات لبنی و غیرلبنی جدا شده‌اند. شناسایی و انتخاب این سویه‌های وحشی از پنیرهای سنتی در سراسر جهان به منظور تهیه کشت‌های مهم و جدید صنعتی مورد بررسی قرار گرفته است. شناسایی فلور لاکتیکی طبیعی پنیرهای سنتی اولین گام در جهت توسعه آغازگرهایی است که در تولید پنیر صنعتی به کار می‌روند تا با استفاده از این آغازگرها ضمن حفظ منابع ژنتیکی بومی، فرآورده‌های صنعتی با بافت یکنواخت و دارای خصوصیات عطری و طعمی گسترده تولید گردد (Perin, et al., 2017; Albayrak and Duran, 2021). در مطالعه حاضر، لاکتوباسیل‌های ایزوله شده و قدرت تولید اسید، تغییرات pH توسط جدایه‌های لاکتوباسیلوس در زمان‌های مختلف و بهترین دما برای رشد این سویه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های پنیر از ۱۲ روستای شهرستان مراغه به‌طور تصادفی انتخاب و در فالکون‌های استریل و در مجاورت بسته‌های یخی به آزمایشگاه منتقل و تا شروع آزمایش در دمای یخچال ۴ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

شناسایی و جداسازی لاکتوباسیلوس

به منظور آنالیزهای میکروبی مقدار ۲۵ گرم نمونه تحت شرایط استریل به ۲۵ میلی‌لیتر محلول سیترات‌سدیم ۲ درصد (وزنی/حجمی) در دمای ۴۵ درجه سلسیوس اضافه و به مدت ۱ دقیقه هموژن گردید، سپس ۱۰ میلی‌لیتر از رقت حاصله به ۹۰ میلی‌لیتر محیط MRS (Man, Rogosa, Sharp) براث (شرکت سیگما-آلدریچ آمریکا) انتقال یافت تا باکتری‌ها به حداکثر رشد خود برسند و در شرایط کم هوازی (شرایط اتمسفری با فشار اکسیژن پایین) و در دمای۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه-گذاری گردید.

در مرحله بعد مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط حاصله در محیط کشت MRS آگار به‌صورت سطحی کشت داده شد و پلیت به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بصورت بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شد. سپس تمام کلنی‌های تشکیل شده از نظر تست کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم مورد ارزیابی قرار گرفتند و نمونه‌های مربوط به باکتری‌های میله‌ای شکل، گرم مثبت و کاتالاز منفی جهت استوک گیری و استخراج DNA در محیط کشت MRS براث داخل فالکون کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷

درجه سلسیوس در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. سپس PCR (Polymerase Chain Reactoin) و آزمایشات تکمیلی به منظور شناسایی و تشخیص کامل جدایه‌های لاکتوباسیل‌ها از نظر جنس صورت گرفت که این آزمایشات شامل: تست اکسیداز، تغییرات pH توسط جدایه-های لاکتوباسیلوس طی زمان‌های صفر، ۴، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تعین قدرت تولید اسید توسط جدایه‌های لاکتوباسیلوس، تعیین بهترین دما در محدوده دمایی ۳۰ تا ۴۵ درجه سلسیوس برای رشد جدایه‌های لاکتوباسیلوس، تعیین فعالیت پروتئازی و لیپازی سویه‌ها بودند. در این قسمت هدف جداسازی، شناسایی و تشخیص جنس لاکتوباسیل‌ها بود (Erkkila, et al., 2000; Demirci, et al., 2021).

استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام شد. ترکیبات لیز بافر (شرکت Merck آلمان) شامل تریس ۱ مولار با pH=۸، کلرید سدیم (۸۲/۸۱ گرم بر لیتر)، EDTA-Na_2 (۷/۴۴ گرم بر لیتر) و پلی وینیل پرولیدون ۲ درصد و آب مقطر می‌باشد. برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از ژل آگارز ۰/۸ درصد در الکتروفورز به کار گرفته شد. محلول رنگ‌آمیزی ژل آگاروز، Sibere green (۱۰ میلی-گرم بر میلی‌لیتر) بود.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تکثیر قطعه ژن 16S rRNA

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن 16S rRNA انجام شد. در این تحقیق از پرایمرهای به کار رفته توسط (Angelis, et al., 2001) استفاده شد. که توالی آغازگرهای استفاده شده به شرح زیر است:

5´- LACF: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3´

5´- TACCTTGTTAGGACTTCACC- LACR: 3´

واکنش زنجیرهٔ پلیمرازی با چرخه‌های واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۲ چرخه با مرحله واسرشت سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱/۵ دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. واکنش PCR با ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (شرکت سیناژن)، پرایمر رفت و برگشت هر کدام به ترتیب ۰/۴ میکرولیتر و ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA و رساندن حجم نهایی واکنش با آب مقطر استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد.

آشکارسازی قطعات ژنی روی ژل آگارز

با انجام الکتروفورز ژل آگارز برای فرآورده‌های حاصل از استخراج DNA ژنومیک باکتریایی و محصولات PCR، بعد از رنگ‌آمیزی ژل با محلول سایبر گرین و در زیر نور UV (دستگاه ژل داک)، اطلاعات اولیه مربوط به DNA الگو و نتیجه PCR با ظهور باندهایی فراهم شد. برای تهیه ژل آگارز به غلظت ۱درصد،۱ گرم از پودر آگارز توزین و توسط حرارت در۱۰۰ میلی‌لیتر بافر X_1TAE حل گردید. پس از انحلال کامل و کاهش دما، محلول تهیه شده در ظرف الکتروفورز مناسبی (سینی الکتروفورز) که قبلاً شانه گذاری شده بود، ریخته شد. پس از آماده شدن ژل و جداکردن شانه، ظرف به تانک الکتروفورز حاوی X_1TAE انتقال یافت. نمونه‌های DNA به نسبت ۵ به ۱ با بافر بارگذاری (Loading Buffer) 6X مخلوط شده و در چاهک‌های ژل ریخته شدند. ولتاژ دستگاه در حدود ۱۰۰mV- ۸۵ تنظیم شد و نمونه‌ها به مدت ۱/۵-۱ ساعت روی ژل مذکور الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز، ژل از تانک خارج گردید و در محلول سایبرگرین قرار داده شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، ژل از محلول رنگ خارج شده و با آب شستشو داده شد و باندهای مربوطه با استفاده از دستگاه UV مشاهده گردید. پس از تکثیر قطعه 16S rRNA با پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی اولیه گونه‌ها، با استفاده از آنزیم‌های برشی، برش داده شدند. انتخاب آنزیم برشی بر اساس جایگاه برشی توالی‌های ثبت شده در

Genebank برای سایر گونه‌های ثبت‌شده انجام شد. برای هر محصول PCR، واکنش‌های هضم به طور جداگانه با آنزیم‌های آورده شده در زیر انجام گردید.

برش آنزیمی DNA ریبوزومی تکثیر شده با PCR(ARDRA)[1]

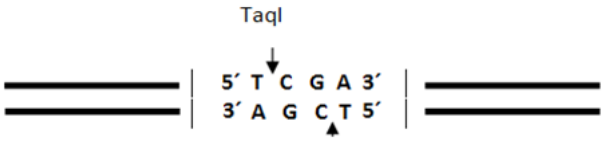
واکنش‌های هضم به مدت ۱۲ ساعت طبق دمای فعالیت آنزیم در بن‌ماری انجام شد. در پایان، محصولات هضم آنزیمی با استفاده از آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و نوارهای حاصل از برش در زیر نور UV مشاهده و عکس‌برداری انجام شد. بعد از عکس‌برداری، الگوی نواری بدست آمده با الگوی نواری تهیه شده بوسیلهٔ برنامهٔ نرم افزار docGen از توالی-های 16S rRNA گونه‌های *لاکتوباسیل* ثبت شده در NCBI، مقایسه و گونه‌های مورد نظر تا حدودی تشخیص داده شدند. آنزیم‌های مورد استفاده و توالی مربوطه عبارت بودند از موارد ذکر شده در جداول ۱و۲. همچنین شمای برش آنزیم‌های مورد استفاده در شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- مشخصات آنزیم مورداستفاده برای برش آنزیمی

نام آنزیم	توالی برشی ´۵ به ´۳	دمای فعالیت
TaqI	TCGA	۶۵ درجه سلسیوس

جدول ۲- اجزاء تشکیل‌دهندهٔ واکنش‌های هضم آنزیمی با حجم ۲۰ میکرولیتر

ترکیب	حجم (میکرولیتر)
آنزیم برشی	۱
محصول واکنش پلیمرازی	۳
بافر آنزیم	۲
آب دیونیزه	۱۴



شکل ۱- محل برش داده شده توسط آنزیم

تعیین فعالیت پروتئازی سویه ها

برای تعیین فعالیت پروتئازی سویه‌ها، جدایه‌های شناسایی شده بر روی پلیت حاوی محیط شیر بدون چربی باز ساخته ۱۰ درصد آگاردار کشت شد و به مدت ۲۰-۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردید. کلنی‌هایی که اطراف آنها هاله شفاف تشکیل شده بود به عنوان سویه‌های دارای فعالیت پروتئازی در نظر گرفته شد. برای تایید فعالیت پروتئازی سویه‌ها و مقایسه آن با روش فوق، تمامی جدایه‌های شناسایی شده که DNA آنها قبلا استخراج شده و در۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شده بود، توسط پرایمرهای اختصاصی {P6(S):5'-CAACACGGCATGCATGTTGC-3' &{P7 (A): 5'-CTGGCGTTCCCACCATTCA-3' تعریف شده توسط Isabel و همکاران، مورد استفاده قرار گرفته و سپس واکنش PCR انجام شد (Poveda, et al., 2003; Saarela, et al., 2000; Alizadeh Behbahani and Noshad, 2021).

تعیین فعالیت لیپازی سویه‌ها

برای تعیین فعالیت لیپازی سویه‌ها جدایه‌های شناسایی شده بر روی پلیت حاوی محیط [Nutritive agar and 1% (v/v) & cream of milk(38% fat)] کشت شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردید. کلنی‌هایی که اطراف آنها هاله شفاف تشکیل شده بود به عنوان سویه‌های دارای فعالیت لیپازی در نظر گرفته شود (Settanni, et al., 2010).

تعیین قدرت تولید اسید توسط جدایه های لاکتوباسیلوس

نمونه‌هایی که از نظر PCR و آزمایشات افتراقی فنوتیپی و بیوشیمیایی لاکتوباسیلوس شناسایی شدند را به مقدار ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت MRS براث حاوی لاکتوباسیلوس در شرایط کاملا استریل توسط پیپت به داخل ارلن مایر که حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر شیر استریل است انتقال داده شد. لازم به ذکر است که دمایی که در کل آزمایش برای رشد باکتری در داخل شیر مورد استفاده قرار گرفت دمای ۳۰، ۳۷، ۴۲ و ۴۵ درجه سلسیوس بود. بعد از تلقیح باکتری و

[1]. Amplified ribosomal DNA and restriction analysis

شیر استریل، اندازه گیری اسیدیته و pH در زمان‌های صفر، ۴، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، انجام شد.

آنالیز آماری

روش آنالیز آماری مورد استفاده، طرح اندازه‌های تکراری (Repeated Measure) می‌باشد که عبارتند از اندازه‌های یک متغیر مشخص، برای هر مورد، در چند وضعیت مختلف است. این طرح حالت تعمیم یافته آزمون مقایسه زوجی است و در این آزمون یک گروه در دو یا چند وضعیت مقایسه می‌شوند.

نتایج و بحث

ویژگی‌های بیوشیمیایی

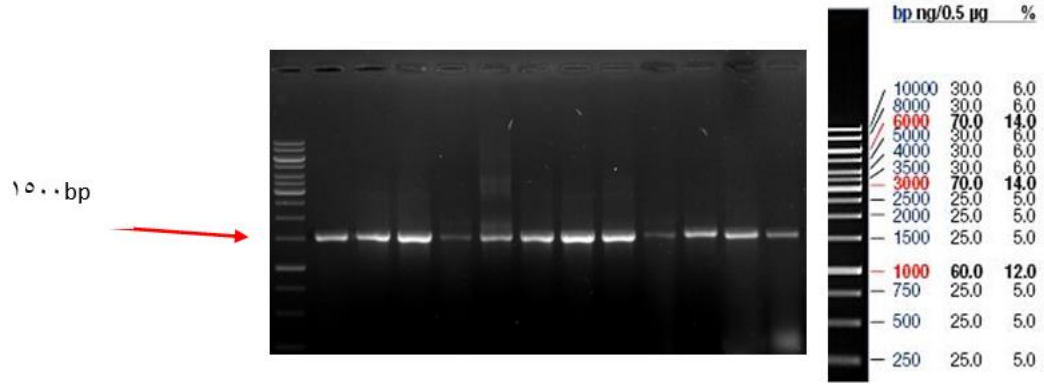
در طی بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتری‌ها، هر ۱۲ نمونه گرم مثبت، کاتالاز منفی، اکسیداز منفی و غیرمتحرک بودند که نشان دهنده لاکتوباسیل بودن آنهاست و جنس لاکتوباسیلوس در آزمایشات دمایی و اسیدیته و pH مدنظر می‌باشد.

آزمون PCR

با توجه به این نکته که دیواره پپتیدوگلیکانی لاکتوباسیل‌ها بسیار سخت و مقاوم است، بنابراین روش‌های متداول لیز سلولی برای از بین بردن و لیز کردن با اندکی تغییرات انجام و سپس استخراج DNA انجام شد. غلظت DNA ژنومیک استخراج شده، از طریق قیاس با سایز مارکربر روی ژل آگارز ۱ درصد تخمین زده شد. بهترین خلوص عدد نزدیک به ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر بود که این غلظت از DNA استخراج شده، برای آزمایشات بعدی شناسایی مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

تکثیر توالی‌های ژن 16S rRNA ایزوله‌های *لاکتوباسیلوس*

با توجه به اندازه ژن 16S rRNA که در حدود ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید می‌باشد، تکثیر حاصل از واکنش پلیمرازی با پرایمرهای ذکر شده، وجود یک قطعه ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتیدی را تایید کرد. همان طوری که در شکل زیر دیده می‌شود وجود باندهای شارپ با اندازه ۱۵۰۰ bp نشان دهنده موفقیت‌آمیز بودن پرایمرها برای تکثیر ژن 16S rRNA را نشان می‌دهد.



شکل ۲- نتایج PCR مربوط به تکثیر قطعه ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید ژن 16S rRNA با جفت آغازگر lacF و lacR سایز مارکر: 1Kb (M)DNA Ladder.

در آزمایش PCR همه جدایه‌ها قابل شناسایی نبودند و برای صحت پرایمر لاکتوباسیلوس فرمنتوم ATCC ۹۳۳۸ بعد از تنظیم کردن دستگاه PCR از ۱۲ ایزوله ۱۰ جدایه دارای ژن پروتئازی بودند و فقط دو جدایه از این نظر منفی بود.

تغییرات اسیدیته

در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با گذشت زمان از صفر تا ۴۸ ساعت، اسیدیته افزایش یافت ولی در زمان ۴۸ تا ۷۲ ساعت (به غیر از نمونه شماره ۲ ، ۳ ، ۷ و۱) کاهش اسیدیته مشاهده گردید (p value=0). در این دما کمترین اسیدیته مربوط به نمونه شماره ۸ در زمان ۴ ساعت بود که میزان آن ۱/۶ می باشد و بیشترین اسیدیته مربوط به نمونه شماره

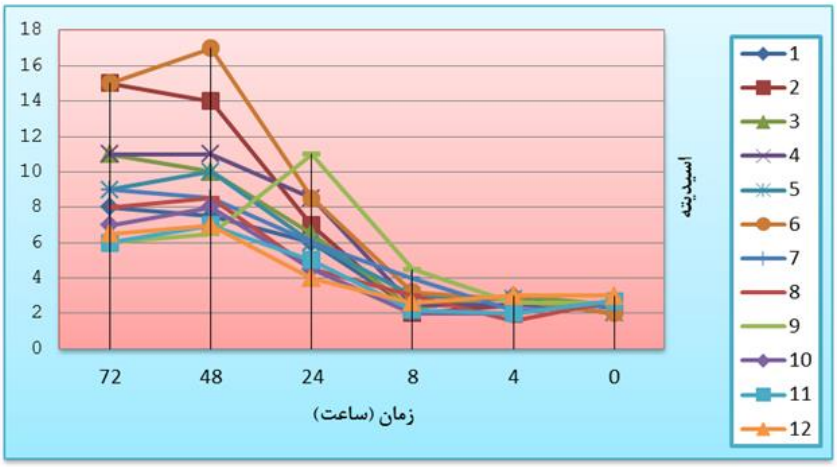
۶ در زمان ۴۸ ساعت، که میزان آن ۱۷ می‌باشد. در دمای ۳۷ درجه سلسیوس اسیدیته از زمان صفر تا ۴۸ ساعت افزایش یافت و در زمان ۴۸ تا ۷۲ ساعت (به غیر از نمونه های ۲ ، ۳ ، ۷ و ۱) کاهش اسیدیته مشاهده گردید (p value=0). حداکثر اسیدیته در این دما مربوط به نمونه شماره ۶ در زمان ۴۸ ساعت می‌باشد که میزان آن ۱۶ و حداقل آنها ۲ بود که مربوط به چند نمونه و زمان‌های مختلف می‌باشد. در دمای ۴۲ درجه سلسیوس از زمان صفر تا ۴۸ ساعت افزایش اسیدیته مشاهده گردید و تا ۷۲ ساعت (به جز نمونه شماره ۱) کاهش اسیدیته مشاهده شد (p value=0). حداکثر اسیدیته مربوط به نمونه شماره ۱ و در زمان ۴۸ ساعت و به میزان ۱۸ بود. در دمای ۴۵ درجه سلسیوس از زمان صفر تا ۴۸ ساعت افزایش اسیدیته و در زمان ۴۸ تا ۷۲ ساعت (به غیر از نمونه شماره ۹ و ۱۲) کاهش اسیدیته در نمونه‌ها مشاهده شد (p value=0). در این دما حداقل اسیدیته ۲ و حداکثر اسیدینه مربوط به نمونه ۶ بود که در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ اتفاق افتاد. افزایش در اسیدیته در زمان‌های مختلف بدلیل افزایش فعالیت *لاکتوباسیلوس‌ها* و تولید اسید بیشتر می‌باشد و همانطور که در نمودارها هم مشاهده می‌گردد با پیشرفت زمان، میزان اسیدیته در برخی دماها کاهش می‌یابد که بدلیل کاهش تعداد و فعالیت *لاکتوباسیلوها* می‌باشد. (نمودارهای ۱ و ۲ و ۳ و ۴).

تغییرات pH

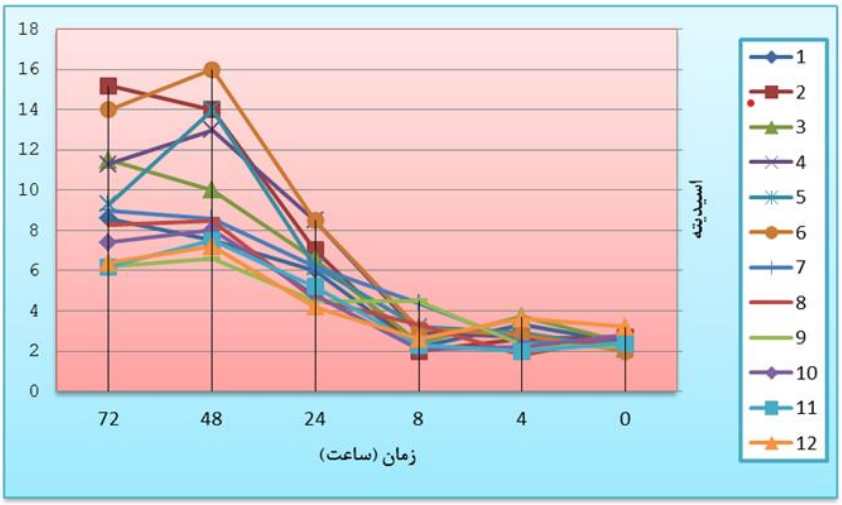
در دمای ۳۰ درجه سلسیوس از زمان صفر تا ۷۲ ساعت کاهش pH مشاهده گردید و نمونه شماره ۹ از زمان صفر تا ۲۴ ساعت با کاهش pH همراه بود ولی از زمان ۲۴ تا ۷۲ ساعت، pH افزایش یافت و حداکثر pH مربوط به نمونه ۱۱ در زمان ۸ ساعت که میزان آن ۶/۵۹ بود و حداقل آن مربوط به نمونه شماره ۲ در زمان ۷۲ ساعت بود که میزان آن ۳/۷ بود (p value=0). در دمای ۳۷ درجه از زمان صفر تا ۷۲ ساعت pH با کاهش همراه بود و با این استثنا که در نمونه شماره ۹ از زمان صفر تا ۲۴ ساعت pH کاهش پیدا کرد و از ۲۴ تا ۷۲ ساعت افزایش داشت و در نمونه شماره ۱ از صفر تا ۴۸ کاهش pH و در زمان‌های ۴۸ تا ۷۲ ساعت افزایش در این پارامتر مشاهده گردید (p value=0). در دمای ۴۲ درجه سلسیوس در نمونه شماره ۳ از زمان صفر تا ۴۸ ساعت کاهش pH مشاهده شد و از ساعت ۴۸ تا ۷۲ ساعت، افزایش pH وجود داشت و حداکثر pH مربوط به نمونه شماره ۹ در زمان ۸ ساعت و میزان آن ۶/۵۸ می باشد و حداقل آن مربوط به نمونه ۳ و در زمان ۴۸ ساعت می‌باشد که میزان آن ۳/۸۸ بود (p value =0). در دمای ۴۵ درجه سلسیوس حداکثر pH مربوط به نمونه ۱ در زمان صفر بود و میزان آن ۶/۶ می‌باشد و حداقل آن مربوط به نمونه شماره ۲ در زمان ۴۸ ساعت،که میزان آن ۴/۰۷ بود. همانطور که مشاهده شد در زمان‌های مختلف کاهش میزان pH که بدلیل اسیدی شدن محیط در نتیجه افزایش فعالیت *لاکتوباسیلوس‌ها* می‌باشد ولی با گذشت زمان و در زمان-های نهایی میزان pH افزایش می‌یابد که بدلیل کاهش فعالیت *لاکتوباسیلوس‌ها* می‌باشد (نمودارهای ۵ و ۶ و ۷ و ۸).

در سال ۱۳۹۴ سلیمی نمین و همکاران گونه‌های *لاکتوباسیلوس* را از شیر خام از دو مرکز جمع آوری شیر مناطق اردبیل و سراب جداسازی و شناسایی کردند و توانایی کاهش pH جدایه‌ها به منظور کاربرد تکنولوژیکی آنها در تولید اسید لاکتیک را مورد بررسی قرار دادند. تحلیل آماری روند کاهش pH محیط کشت مایع MRS توسط شش جدایه‌ی حاصل در بازه زمانی ۴ تا ۴۸ ساعت نشان داد که بین جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و دامنه تغییرات pH توسط جدایه‌های مورد بررسی طی ۴۸ ساعت در محیط کشت از ۱/۶۵ تا ۲/۰۵ متغیر بود. دامنه تغییرات pH پس از ۲۴ ساعت برای سویه‌های *لاکتوباسیلوس* جداسازی شده حسنی و همکاران (۲۰۰۸) از ۰/۷۷ تا ۲/۴۵ گزارش شده است. نتایج کاهش میزان pH با نتایج تحقیق کای و همکاران (۲۰۰۷) و پیراینو و همکاران (۲۰۱۰) نیز مطابقت داشت. آزیز و همکاران (۲۰۰۹) نتایج مشابهی به دست آوردند و نشان دادند که نوسان pH، غلظت نمک و دما تاثیر قابل ملاحظه‌ای در رشد باکتری-

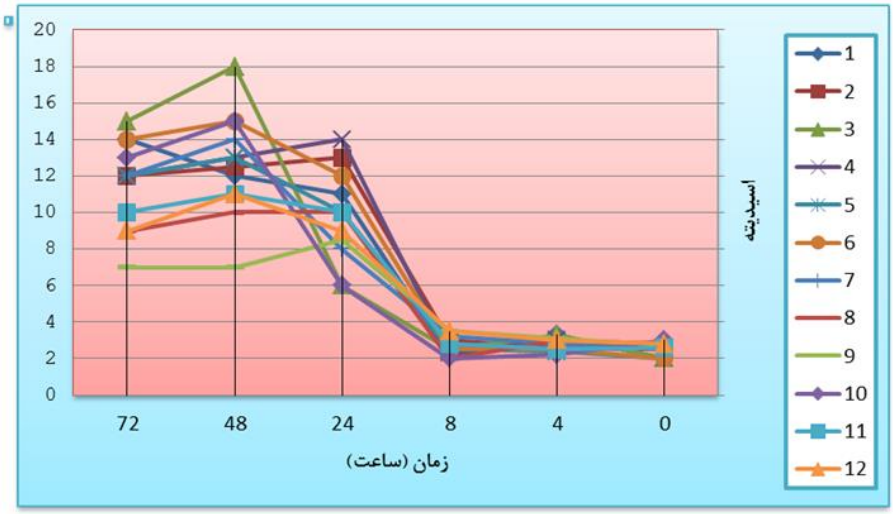
های تولید کننده اسید لاکتیک داشتند. اسیدی و همکاران (۲۰۰۹) ضمن جداسازی و شناسائی ۱۷ سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از یک فراورده تخمیری سنتی گوشتی خصوصیات تکنولوژیکی آنها را مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه همه سویه‌ها قدرت تولید اسید لاکتیک خوبی داشتند به نحوی که همه آنها در عرض ۷۲، ۴۸ و ۲۴ ساعت به ترتیب در دمای ۱۵، ۲۵ و ۳۷ درجه سلسیوس pH محیط را به کمتر از ۴/۲ کاهش دادند. اکثر سویه‌ها خاصیت ضدمیکروبی علیه (*Salmonella arizonae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeuroginosa* and *E.coli*) نشان دادند. همه سویه‌ها قادر به هیدرولیز کازئین بوده و هیچ کدام فعالیت لیپولیتیک نداشتند. و اکثر سویه‌ها نسبت به Tetracycline, Erythromycin, Rifampicin, Ampicillinو Penicillin G مقاوم بودند. در این مطالعه، در همه ۱۲ نمونه پنیر سنتی مراغه همانطور که در نمودارهای ۱ تا ۸ نشان می دهد، روند کاهش pH و افزایش اسیدیته محیط کشت مایع MRS در بازه زمانی ۴ تا ۷۲ ساعت وجود داشت. که نتایج حاصله به یافته‌های سایر پژوهشگران مطابقت دارد. میانگین افزایش اسیدیته در دمای ۴۲ درجه سلسیوس و در مدت زمان ۴۸ ساعت نسبت به دماهای مورد بررسی بیشترین مقدار بود. کمترین میزان pH نیز در دمای ۴۲ درجه سلسیوس بود. نتایج آزمایشات صورت گرفته در نمودارهای ۱ تا ۸ نشان داده شده است.



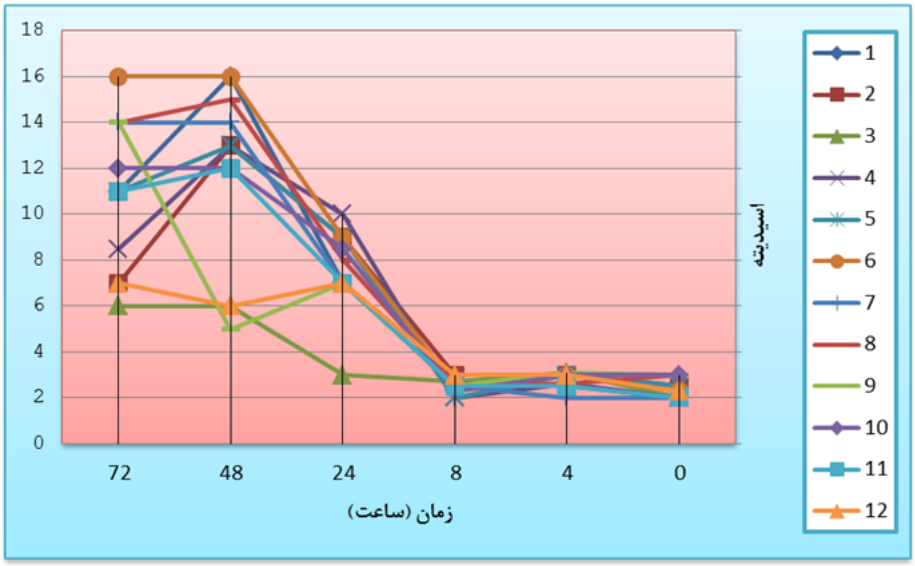
نمودار ۱- نتایج حاصل از تغییرات اسیدیته توسط جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* طی زمان‌های مختلف در دمای ۳۰ درجه سلسیوس.



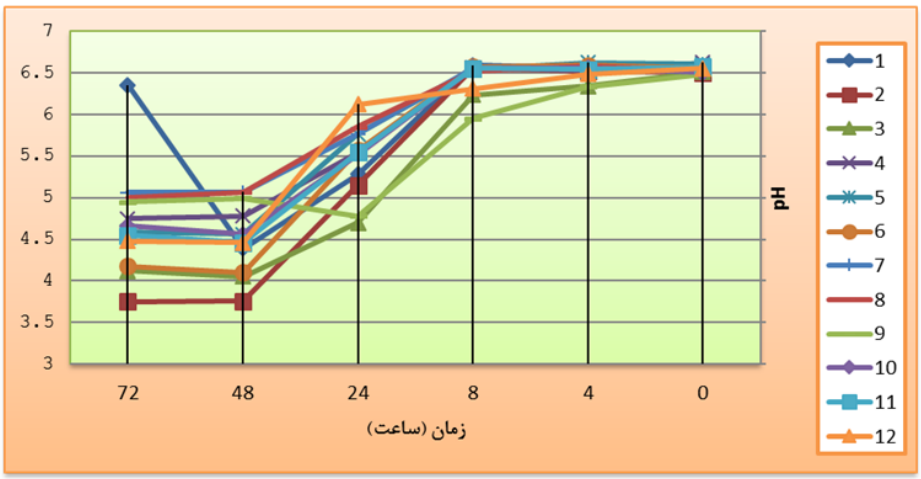
نمودار ۲- نتایج حاصل از تغییرات اسیدیته توسط جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* طی زمان‌های مختلف در دمای ۳۷ درجه سلسیوس.



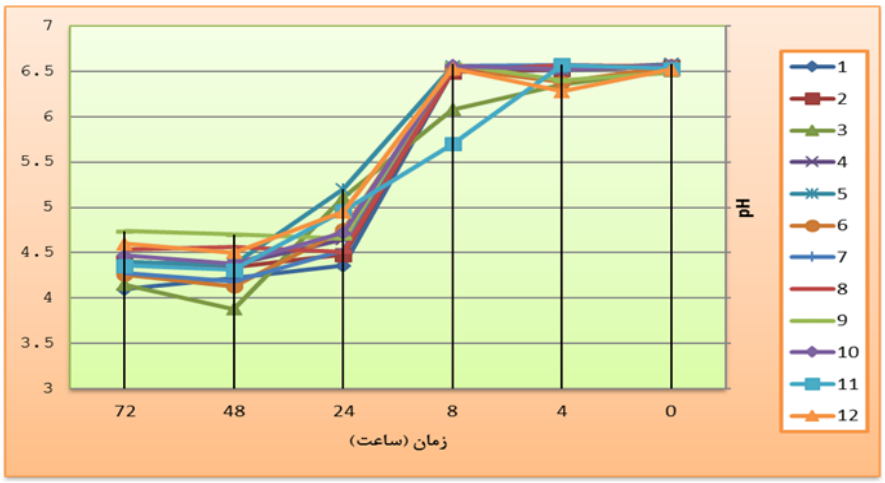
نمودار ۳- نتایج حاصل از تغییرات اسیدیته توسط جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* طی زمان‌های مختلف در دمای ۴۲ درجه سلسیوس.



نمودار ۴- نتایج حاصل از تغییرات اسیدیته توسط جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* طی زمان‌های مختلف در دمای ۴۵ درجه سلسیوس.

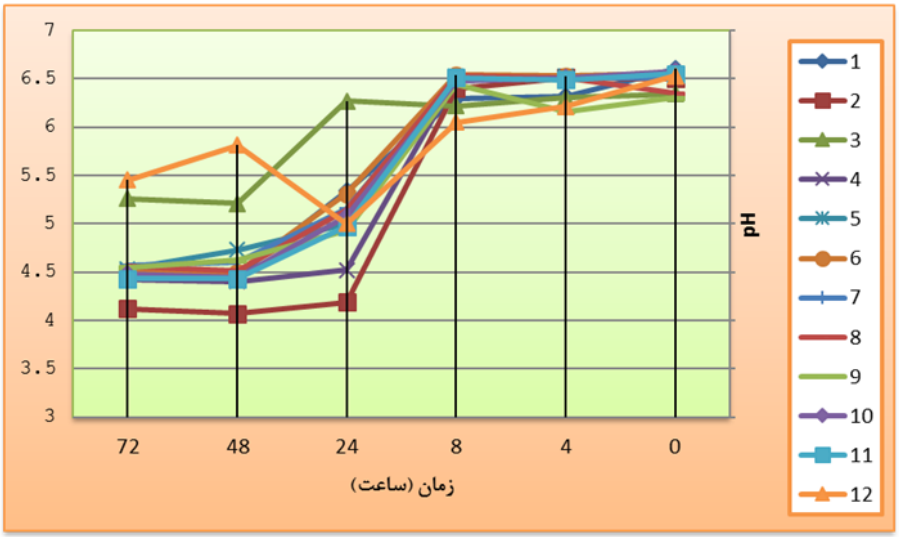


نمودار ۵- نتایج حاصل از تغییرات pH توسط جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* طی زمان‌های مختلف در دمای ۳۰ درجه سلسیوس.



نمودار ۶- نتایج حاصل از تغییرات pH توسط جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* طی زمان‌های مختلف در دمای ۳۷ درجه سلسیوس.

نمودار ۷- نتایج حاصل از تغییرات pH توسط جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* طی زمان‌های مختلف در دمای ۴۲ درجه سلسیوس.



نمودار ۸- نتایج حاصل از تغییرات pH توسط جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* طی زمان‌های مختلف در دمای ۴۵ درجه سلسیوس.

نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد پنیر سنتی مراغه، منبع باارزشی از باکتری‌های لاکتوباسیل می‌باشد که جزء باکتری-های پروبیوتیک محسوب می‌شوند. وجود این نوع باکتری‌ها در پنیر سنتی به مصرف کنندگان این اجازه را می‌دهد که راه جدیدی برای بهره‌مندی از سلامتی بیابند. زیرا این باکتری‌ها می‌تواند سلامت دستگاه گوارش را بهبود بخشیده و سیستم ایمنی را تقویت کند. ضمناً این باکتری‌ها دارای ویژگی‌های تکنولوزیکی بوده و نقش مهمی در تولید و رسیدگی پنیر ایفا می‌کنند و از آنها می توان به عنوان کشت الحاقی در صنایع لبنی استفاده کرد. به منظور کاربرد این باکتری‌ها در مقیاس صنعتی، توجه بیشتری باید معطوف به شناسایی دقیق‌تر این گونه‌ها و در سطح زیر گونه‌ها گردد. جهت دستیابی به این هدف، تکنیک‌های دقیق‌تری مانند روش‌های مولکولی مورد نیاز می باشد.

منابع

1.Tajabadi M., Heydari M. and Jafari P. 2011. Health and traditional Iranian dairy products. First National Conference of Probiotic and Functional Foods.

2. Salimi N., Khorami M., Maghsoudlou Y. and Mirzanamadi F. 2015. Isolation and identification of Lactobacillus spp. from raw milk and determination of their acid producing ability. EJFPP, 7(1): 61-76.

3. Mirdamadi S. and Tangestani M. 2011. Screening and characterization of bacteriocins produced by some Strains of Lactobacillus spp isolated from Iranian Dairy products. JFH, 3(3):55-69.

4. Alizadeh Behbahani B. and Noshad M. 2021. Isolation and Identification of Lactobacillus Strains from Behbahan Local Cheeses and Investigation of Technological and Antimicrobial Properties of These Strains against Food Pathogens. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 16:1, Spring 2021.

5. Albayrak Ç. and Duran M. 2021. Isolation and characterization of aroma producing lactic acid bacteria from artisanal white cheese for multifunctional properties. LWT –FoodScience and Technology150(2021)112053.

6. Angelis M., Corsetti A., Tosti N., Rossi J., Corbo M.R. and Gobbetti M. 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. Appl Environ Microbiol. May; 67(5):2011-20.

7. Ayele N., Siv A. and Goran M. 2001. Randomaly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) profilesfor the distinction of *Lactobacillus* species. Antonie van Leeuwenhoek, 79:1-6.

8. Cai H., Rodriguez B.T., Zhang W., Broadbent J.R. and Steele J.L. 2007. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. Microbiology. (153) 2655-2665.

9. Cakir I. 2003.Determination of Some Probiotic Properties on Lactobacilli and Bifidobacteria, PhD Thesis, Ankara University, Ankara.

10. Charles B., Prstt MD. Colorectal carcinoma in adolescents implications regarding etiology. Large Bowel Cancer Workshop., 40: PP; 2464-2472.

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

12. Demirci T., Akin A., ozeri Atik D., Rabia ¨Ozkan E., Dertlic E. and Akyol I. 2021. Lactic acid bacteria diversity and dynamics during ripening of traditional Turkish goatskin Tulum cheese produced in Mut region assessed by culturing and PCR-DGGE. LWT –FoodScience and Technology138(2021)110701.

13. Ehsani A., Mahmoudi R., Hashemi M. and Raeisi, M. 2014. Identification of *Lactobacillus* Species Isolated from Traditional Cheeses of West. Iranian Journal of Medical Microbiology.

14. Erkkila S. and Petaja E. 2000 . Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Science,(55)297-300.
15. Essid I, Medini M and Hassouna M. 2009. Technological and safety properties of Lactobacillus plantarum strains isolated from a Tunisian traditional salted meat, Meat Science, (81)203–208.
16. Garabal I.J., Rodriguez-Alonsa P. and Acenteno J. 2008. Characteization of actic acid bacteria isolated from raw cow's milkcheese currently produced in Galicia(NW Spain). Food science and Technology, (41)1452-1458.
17. Hasani M., Farajnia S., Hesari J. and Musavi M. H. 2008. Isolation of two species of lactobacillus from traditional Lighvan cheese and determination of their important functionality properties. 18th national congress of food technology Mashhad. I. R. Iran.
18. Herreros M.A., Fresno J.M., Gonzalez Prieto M.J. and Tornadijo M.E. 2007. Technological characterization of acid lactic bacteria isolated from armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). International Dairy jornal. (13)469-479.
19. Klaenhammer T.R. 2000. Probiotic bacteria: today and tomorrow. Journal of Nutrition, (130)415- 416.
20. Parsaeimehr M., Khazaei M., Jebellijavan A. and Staji H. 2019. The Isolation and Identification of Dominant Lactic Acid Bacteria by the Sequencing of the 16S rRNA in Traditional Cheese (Khiki) in Semnan, Iran. Journal of Human, Environment, and Health Promotion.V; 5(1):15-20.
21. Perin L.M., Savo Sardaro M.L., Nero L.A., Neviani E. and Gatti M. 2017. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. Food Microbiology, 65, 160–169.
22. Piraino P., Zotta T., Ricciardi A., McSweeny P.L.H. 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.
23. Poveda J.M., Sousa M.J., Cabezas L. and McSweeney P.L.H., 2003. Preliminary observations on proteolysis in Manchego cheese made with a defined-strain starter culture and adjunct starter (Lactobacillus plantarum) or a commercial starter. International Dairy Journal. (13)169–178.
24. Saarela M., Mogensen G., Fonde'n R., Matto J. and Mattila- sandholm, T., 2000. Probictic bacteria: safety, functional and techniligical properities. Journal of Biotechnology., 84(3):197-515.
25. Settanni L., Franciosi E., Cavazza A., Cocconcelli P.S. and Poznanski. 2010. Extension of Tosela cheese shelf life using non-starter lactic acid bacteria. Food Microbiology. (69)1-8.
26. Tavaria F.K and Malcata F.X. 2003. Enzymatic activities of non starter lactic acid bacteria isolated from a traditionalPoruguese cheese. Journal of Enzyme and Microbiol Technology, (33)236-243.

Isolation and determination of technological characteristics of lactobacillus of traditional Maragheh cheese

Mirzaai tash O[1*], Shabkhiz MA[2]

1. Food Science and technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, tabriz, Iran.
2. Graduated of Food Science and technology, Urmia University, Food industry teacher of Agriculture vocational school, Maragheh, Iran.

[*]**Corresponding author:** *Aradtech.group@yahoo.com*

Received: 29 September 2021 Accepted: 06 February 2022

Abstract

Probiotic bacteria are microbial food supplements that are present in appropriate amounts in the digestive system and are beneficial to human health. Among the probiotic bacteria, lactobacillus most common type of bacteria that are in dairy products and production lactic acid during the fermentation. The aim of this study was to isolate and identify of lactobacillus from bacteria flora of traditional Maragheh cheese and determine the technological properties their lipolitic and protolithic activity. For this purpose lactic bacteria isolated by common methods of cultivation and identification according to PCR and biochemical properties and then done supplementary tests for full recognition present isolates such warm coloration, oxidase, catalase test, and ability of acid production and pH changes by lactobacillus evaluated during different times and optimum temperature for growth. Results shown that in all samples to passing time acidity increased and pH decreased. Acidity increased in all samples and in temperature 30, 37, 42, 45°c and during 0, 4,8,24,48 h and observed in 48 to 72 h in several samples low decrease and also pH was regular decrease in all samples and high temperature to 48 h and in 48 to 72 h in most samples and temperatures were fixed amount.

Keywords: Lactobacillus, PCR, Traditional Maragheh cheese.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited Copyright © 2022 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.