مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۴۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶ (ص ۳۵-۲۹)

جداسازی و شناسایی باکتری‌های لاکتیکی حاصل از فرآورده لبنی سنتی (ریچال ماستی)

فرزاد کریم پور[۱]، سید هادی رضوی[۲]*، فلورا تخرونی[۳]

۱. دکترای بیوتکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده بهداشت، کارشناس معاونت غذا دارو، یاسوج

۲. استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری ، دانشگاه تهران

۳. استاد، انسیتوی بیوتکنولوژی آکادمی علوم ارمنستان، ایروان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲ – تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۹/۲۰)

چکیده

در این مطالعه، مقداری ریچال از ماست سنتی و سبزیجات محلی در مشک تهیه گردید. در شرایط استریل نمونه‌برداری و کشت در محیط‌های اختصاصی، جدا و خالص‌سازی سوش‌ها لاکتیکی انجام پذیرفت. در ادامه برخی خواص بیوشیمیایی، آنتی‌باکتریایی، همچنین شرایط رشد در دما، زمان و نحوه تلقیح در محیط‌های مختلف بررسی شد. در این مطالعه ۳۰ کلنی جدا و خالص‌سازی شدند که همگی گرم مثبت، تعداد ۲۸ کلنی کاتالاز منفی، ۲۶ کلنی هموفرمنتاتیو، ۱ کلنی هترو فرمنتاتیو، ۲۰ کلنی آئروتولورنت و ۱۰ کلنی بی‌هوازی اجباری بودند. ۱۳ کلنی دارای پایداری حرارتی بودند. بهترین محیط برای رشد سویه‌ها محیط Lacto Agar و Milk Agar بودند و تمام کلنی‌ها شیر را تخمیر کردند. خواص ضدباکتریایی سویه‌ها بر روی سه باکتری باسیلوس تورینجینسیس، باسیلوس سوبتیلوس و سالمونلا تایفی‌موریوم مورد ارزیابی قرار گرفت که همگی دارای خواص آنتی‌باکتریایی بوده ولی سالمونلا مقاومت بیشتری از خود نشان داد. با توجه به نتایج این پژوهش و خوراکی بودن ریچال به نظر می‌رسد این باکتری‌های لاکتیکی پتانسیل بالقوه‌ای جهت استفاده به عنوان استارتر در صنایع لبنی را دارند. در نهایت کلنی‌ها با استفاده از محیط کشت ۶۰ درصد گلیسرول و ۴۰ درصد شیر تخمیر شده در لوله‌های اپندرف و در شرایط استریل برای مطالعات بعدی فریز گردیدند.

واژه‌های کلیدی: اسیدلاکتیک باکتری‌ها، ریچال ماستی، فرآورده لبنی سنتی

مقدمه

سابقه دیرینه اهمیت مصرف محصولات لبنی به علت وجود فلور میکروارگانیزم‌های مفید و متابولیت‌های آن‌ها و سایر مواد تشکیل‌دهنده، نقش آن‌ها در سلامت انسان‌ها همواره پر رنگ بوده است. امروزه بررسی دانشمندان بیوتکنولوژیست نشان داده است که فرآوردهای تخمیری سنتی سرشار از باکتری‌های مفید می‌باشند. استفاده از این باکتری‌ها و همچنین بررسی منابع و شناخت خواص تکنولوژیکی آن‌ها می‌تواند مشکل صنعت را برای تولید فرآورده‌های سلامت محور آسان تر نماید. فرآورده‌های تخمیری و محصولات لبنی به وسیله این باکتری‌ها طی فرآیند تخمیر موادی را تولید می‌نمایند. متابولیت‌های این میکروارگانیزم‌های زنده موادی چون اسیدهای آلی، دی استیل، پراکسید هیدروژن، ترکیبات ضد قارچی و باکتریوسین می‌باشند. این در حالی است که این مواد می‌توانند ترکیبات پروتئینی با خاصیت ضد میکروبی باشند که باعث جلوگیری از رشد سویه‌های حساس شوند (Tkhruni, 2015). به دلیل سازگاری بالایی که برخی از این مواد دارند، می‌توانند در دستگاه گوارش تأثیر مهارکنندگی بر رشد باکتری‌های مضر داشته باشند. مطالعات دیگران حاکی از تاثیر این متابولیت‌ها بر باکتری‌های پاتوژن می‌باشد، ولی استفاده از این پتانسیل برای افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی به منظور توسعه، در صنعت نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد (Haidari *et al*., 2007). این باکتری‌ها و مواد بیولوژیکی حاصل از متابولیسم شان در رده مواد GRAS قرار دارند (Hamidi *et al*., 2013). امروزه بیوتکنولوژیست‌های مواد غذایی به دنبال طراحی محصول جدید با الگوگیری از غذاهای سنتی و حتی استفاده از میکرواورگانیزم های مفید یا متابولیت های آنها می‌باشند زیرا می‌توان با رعایت شرایط بازار و مشتری‌پسندی، تقاضا را برای غذاهای سلامت محور تخمیری که خواص ارگانولپتیکی قابل قبولی را به دنبال داشته باشند، به نحو مطلوبی افزایش داد. این مهم در قالب محصولات جدید و بهبود محصولات موجود به عنوان یک نوآوری، همچنان تحت بررسی‌های دقیق قرارگرفته است (Rajaram *et al*.,2010). این امر طراحی محصولات جدید را به یک ضرورت تبدیل کرده است، همچنین ارتقای فرهنگ مصرف

* نویسنده مسئول: Srazavi@ut.ac.ir

مواد لبنی و به دنبال آن گسترش فزاینده محصولات لبنی صنعتی بجای محصولات سنتی و نفوذ این محصولات به اماکن روستایی امکان از دست دادن بسیاری از باکتری‌های مفید که دارای ارزش تکنولوژیکی می‌باشند را از طریق تغییر جمعیت میکروارگانیسم‌ها را بالا می‌برد. این موضوع خود یک تهدید برای ذخایر ژنتیکی می‌باشد؛ بنابراین شناسایی و جداسازی این منابع سنتی تخمیری و استفاده از آن‌ها به عنوان جایگزینی در تولید و طراحی محصولات لبنی سلامت محور جدید یا ارتقای فرآورده‌های موجود، یک ضرورت می‌باشد. برای رسیدن به این هدف باید به مطالعه فرآورده‌های تخمیری سنتی برای شناسایی باکتری‌های لاکتیکی از این فرآورده ها با استفاده از روش‌های فنوتیپی، میکروسکوپی و ماکروسکوپی، رنگ‌آمیزی گرم، تست های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی و حتی مولکولی جدا و ذخیره‌سازی شوند (Hassani *et al*., 2001).

ریچال یکی از فرآورده‌ای نوشیدنی سنتی تخمیری بر پایه لبنی بوده که در برخی مناطق جنوبی کشور مورد استفاده قرار می‌گیرد. این فراورده به دلیل استفاده از گیاهان بومی و نگهداری و فرآوری آن در مشک، طعم و خواص مناسب و منحصر به فردی دارد. به دلیل حمل‌ونقل راحت مشک و زمان ماندگاری بالای محصول در آن، این روش فراوری توسط بومیان از باستان تاکنون بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. امروزه که استفاده از مشک به حداقل رسید و ریچال در ظروف آلومینیومی و پلی‌اتیلنی تهیه می گردد، زمان ماندگاری آن پایین آمده و خواص ارگانولپتیکی و مقبولیت خود را از دست داده است (Karimpour *et al*., 2011).

با توجه به پیشینه کفیر و خواستگاه آن از مشک و همچنین وجود باکتری‌های مفید موجود در فراورده‌های تخمیری لبنی، هدف از انجام این مطالعه جداسازی و شناسایی فلورلاکتیکی ریچال ماستی و استفاده از آن‌ها در صنایع مختلف غذایی می‌باشد. این مرحله اولین گام برای تهیه استارتر از فراورده های سنتی تخمیری بوده،که احتمالا در آینده بعنوان یک نوآوری در اختیار صنعت قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

تولید ریچال ماستی

مقدار ۱۰ کیلوگرم شیر کامل از روستای ایدنک از شهرستان لنده در استان کهگیلویه وبویراحمد تهیه گردید و در شرایط کاملاً سنتی پخت (دمای جوش ورمان حدود نیم ساعت) و پس از سرد کردن به وسیله مایه ماست سنتی همان منطقه مایه زنی شد. در ادامه گرمخانه‌گذاری در زمان ۲-۳ ساعت در دمای حدود ۴۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت و پس از انعقاد به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. ماست را به مشک دوغی چمتر (مشک عمل‌آوری شده برای نگهداری و تولید دوغ) ریخته و سبزیجات محلی بومی با پیشینه گیاه دارویی شامل کرفس کوهی (کلوس)، موسیر، کاسنی، نعناع (همه گیاهان توسط اساتید گیاه‌شناسی دانشگاه‌های یاسوج، علوم پزشکی اصفهان، شهرکرد و تهران تأیید گردیدند) و نمک به محتوی مشک اضافه گردیدند. مشک حاوی ریچال در سایه بر تلواره[1] (محلی است برای نگهداری مشک که از چهار پایه‌ای تخت مانند که روی آن حصیری از نی مفروش شده است و پایه‌های آن در زمین ثابت می‌باشد) جهت فرآیند در شرایط محیطی به مدت دو تا سه روز نگهداری گردید. سپس در همان شرایط به انسیتوی بیوتکنولوژی ومحصولات آن در کشور ارمنستان برای انجام مطالعات انتقال داده شد.

خصوصیات فیزیکوشیمیایی ریچال اولیه

مقادیر pH و اسیدیته با استفاده از استاندارد ملی ایران (ISIRI, No 4046) اندازه‌گیری و در نهایت کار جداسازی، شناسایی مرفولوژیکی، خاصیت آنتی باکتریایی و همچنین قدرت تخمیر شیر در زمان و دماهای مختلف بررسی گردید.

شمارش کلی ریچال اولیه

برای اندازه‌گیری شمارش کلی باکتری‌ها پس از رقت سازی بر محیط پلیت کانت آگار کشت پورپلیت داده و پس از گرمخانه گذاری تعداد پرگنه‌ها را شمارش و در عکس رفت ضرب می‌کنیم (ISIRI, No 695).

جداسازی سوش‌های لاکتیکی و شمارش کلی‌فرم، کپک و مخمر

نمونه را در شرایط استریل و همگن وزن کرده و با استفاده از آب پپتون ۱:۱۰ رقیق‌سازی مستقیم انجام شد و در بر روی محیط‌های کشت Milk Agar، MRS، M17 و Lacto agar ساخت شرکت هایمدیا کشور هند[2] کشت داده و در دمای انکوباسیون ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از نگهداری در انکوباتور جداسازی سوش‌های لاکتیکی صورت پذیرفت. با توجه به رقت‌سازی انجام شده جهت شناسایی *اشریشیاکلی* از محیط کشت Brilliant Green Bile Broth ساخت شرکت هایمدیا در دمای انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد، برای شمارش کلی‌فرم‌ها از محیط کشت Violet

1 .Talvareh
2 .HiMedia, India

Red Bile Agar تهیه شده از شرکت باسینگ استوک هند[1] در دمای انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد و برای شمارش کپک و مخمرها از محیط Sabouraud Agar تهیه‌شده از شرکت همپشیر انگلستان[2] در دمای انکوباسیون ۲۵ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید (Karimpour *et al*., 2013; Azadnia & Khan Nazer, 2009).

شناسایی فیزولوژیکی باکتری‌های لاکتیکی

بعد از رشد کلنی‌ها بر روی محیط‌های کشت، کار جداسازی، خالص‌سازی، رنگ‌آمیزی گرم، شناسایی میکرسکوپی و تست کاتالاز انجام گرفت. باکتری‌های کاتالاز منفی و گرم مثبت جداسازی گردیدند. کنترل رشد در دماهای ۳۷، ۴۲ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد در طی ۵ روز انجام شد. تست‌های بیوشیمایی و تخمیر شیر انجام پذیرفت. تست شرمن (باکتری‌های جدا شده پس از رشد ۲۴ ساعته در محیط براث (Overnight Culture) از نظر پایداری حرارتی غیرمستقیم در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت و سپس با کشت مجدد بر روی محیط کشت MRS آگار و براث رشد کردند) و سپس زنده‌مانی باکتری‌ها در شرایط این تست اندازه‌گیری گردید (Azadnia & Khan Nazer,2009).

بررسی دمای بهینه، پایداری حرارتی و روند رشد

سوش‌های لاکتیکی جدا شده از کلنی‌های رشد کرده در محیط‌های اختصاصی به MRS براث تلقیح و پس از گرمخانه گذاری طی زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، رشد و بدین صورت رشد ۲۴ ساعته آن‌ها تهیه گردید. سپس رقیق‌سازی با آب مقطر به نسبت ۱ به ۴ صورت گرفت و میزان رشد کلنی در میلی‌لیتر از طریق اندازه‌گیری میزان چگالی با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Cole PRAM) 2800 WV/VIS در طول موج ۵۹۰ nm اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه گردید (Karimpour *et al*., 2013).

اندازه‌گیری خواص آنتی باکتریایی و سوپرناتانت (مایع رویی بعد از کشت ۲۴ ساعته کلنی‌های لاکتیکی)

باکتری‌های عامل فساد مورد آزمایش باسیلوس تورینجینسیس ۱۷-۸۹[3]، باسیلوس سوبتلوس ۸۹-۱۷[4] و سالمونلا تایفی موریوم ۳۸[5] بودند. این پاتوژن‌ها در محیط براث به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مرحله رشد لگاریتمی رسانده شده و برابر نیم مک فارلند استانداردسازی انجام گردید، سپس به صورت چمنی بر محیط‌های کشت پایه از جمله نوترینت آگار و مولر هینتون آگار کشت سطحی داده شدند. از مایع رویی به صورت اسپات تست[6] بر محیط تلقیح شد و پس از گرمخانه گذاری میزان هاله ایجاد شده اندازه‌گیری شد (Tkhruni, 2015).

برای شناسایی باکتری‌های جداشده از نظر هوازی و غیر هوازی بودن، پس از تلقیح سوش‌های خالص در محیط تخصصی MRS، تایوگلیکولات براث[7] در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید. باکتری‌های هوازی و غیر هوازی را با قرار دادن در محیط کشت مایع (تایوگلایکولات براث) با توجه به خصوصیات بیان شده تفکیک گردیدند (Karimpour, 2014).

هوازی اجباری[8] :آن دسته که تنها در حضور اکسیژن توانایی زندگی دارند.

بی هوازی اجباری[9]: گروهی که در حضور اکسیژن توانایی زندگی ندارند.

بی‌هوازی اختیاری[10] :دسته‌ای که توانایی استفاده از الکترون موجود در اکسیژن را هم دارند و درواقع قابل تغییردادن متابولیسم خود به هوازی در محیط‌های حاوی اکسیژن‌اند.

کم هوازی[11]: این عده از باکتری‌ها که به اکسیژن نیاز دارند، اما غلظت عادی اکسیژن موجود در جو برای آن‌ها بیش‌ازاندازه و مرگبار است.

تحمل‌کننده هوا[12]: بی هوازی‌هایی که در حضور اکسیژن هم می‌توانند به فعالیت خود ادامه دهند ولی قادر به استفاده از الکترون اکسیژن نیستند (Akabanda *et al*., 2013).

نتایج

بررسی اولیه خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میکروبیولوژیکی ریچال ماستی

مشخصات و شاخص‌های اولیه فیزیکوشیمیایی و میکروبی

1 .Oxoid Ltd, Basingstoke, India
2 .Hampshire, England
3 .*Bacilus thuringensis17-89*
4. *Bacillus subtilis*-89

5. *Salmonella typhimurium*G-38
6 .Spot Test
7. Thioglycollate
8 .Obligate anaerobes
9. Obligate anaerobes
10 .Facultative anaerobes
11 .Microaerophiles
12 .Aerotolerant organisms

ریچال ماستی از جنوب ایران، منطقه کهگیلویه به در جدول ۱ آورده شده است. نتایج حاکی از عدم رشد *اشریشیاکلی* و میزان پایین کلی فرم بود که این شاخص نشان دهنده عدم آلودگی‌های مدفوعی و رعایت شرایط بهداشتی محصول می‌باشد که با توجه با این نتایج محصول قابل مصرف می‌باشد. از سوی دیگر نتایج پژوهش نشان از کیفیت مطلوب ریچال از نقطه نظر اسیدیته و pH در مقایسه با دوغ طبیعی دارد. نتایج نشان داده شده در جدول ۱ با استاندارد ملی ایران (استاندارد ملی ایران،۴۰۴۶) تطبیق داده شده است (ISIRI Numberm, 4046). (علت این مقایسه استفاده ریچال بعنوان یک نوشیدنی لبنی است).

بررسی میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی گرم اسیدلاکتیک باکتری‌ها مطابق جدول ۲ نشان‌دهنده این واقعیت می‌باشند که تمامی سویه‌های جداشده از ریچال ماستی گرم مثبت و اکثریت جمعیت میکربی کوکسی شکل و کاتالاز منفی می‌باشند.

جدول ۱. بررسی اولیه خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میکروبی ریچال ماستی

پارامتر	اندازه یا تعداد
اسیدیته (تورنر)	۱۵۵
pH	۳/۸
کپک و مخمر	$۱/۴\times۱۰^{۳}$
شمارش کلی میکروب‌ها	۸×۱۰^{۳}
کلی فرم	۴
اشریشیاکلی	منفی

نتایج این پژوهش با نتایج پژوهشگران دیگرکه کار جداسازی و بررسی اسید لاکتیک باکتری‌ها را انجام داده‌اند کاملاً همخوانی دارد (Hassani *et al*., 2001 ; Karimpour *et al*., 2013 ; Patil *et al*., 2010).

جدول ۲. بررسی میکروسکوپی و برخی خواص فیزیومورفولوژی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده ریچال ماستی

کاتالاز				رنگ‌آمیزی گرم				میکروسکوپی			
منفی		مثبت		منفی		مثبت		منفی		مثبت	
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد
۹۲	۲۵	۸	۲	۰	۰	۱۰۰	۳۰	۱۰	۳	۹۰	۲۷

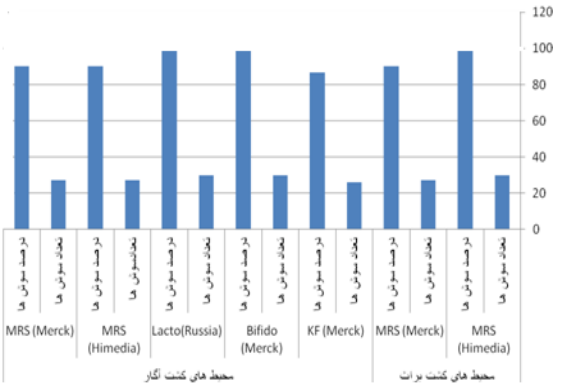
بررسی خواص فیزیومورفولوژی و پایداری حرارتی

برخی خواص فیزیومورفولوژی، بیوشیمیایی و پایداری حرارتی سوش‌های جدا شده از ریچال ماستی در نمودار ۱ نشان داده شده است. نتایج این نمودار نشان داد که اکثریت سویه‌های جدا شده مورد بررسی هموفرمنتاتیو و آئروتولورنت بوده و برخی از این باکتری‌ها لاکتیکی دارای پایداری حرارتی می‌باشند، یعنی بعد از شوک حراتی دوباره در محیط کشت MRS رشد کرده‌اند. همچنین تعدادی از این سویه‌ها بی‌هوازی اجباری بودند.

نمودار شماره ۱. نتایج پایداری حرارتی و خصوصیات فیزیومورفولوژیک اسید لاکتیک باکتری‌های جدا شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

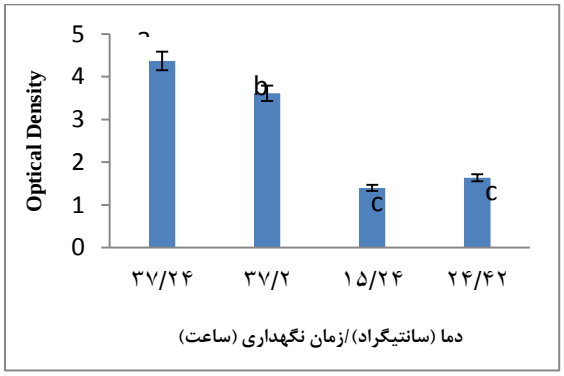
در این نمودار بخشی از خواص فیزیومرفولوژیکی باکتری‌های لاکتیکی حدا شده را در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نشان داده شده است. همچنین موارد فوق برای دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد بررسی گردید. نتایج نشان داد که ۵۴ درصد از سوش‌های جداسازی شده از ریچال ماستی بی‌هوازی اجباری و ۴۶ درصد آئروتولورنت بودند. تست شرمن یا پایداری حرارتی بعد از استرس حرارتی و گذشت ۲۴ ساعت در محیط MRS براث ۱۰ درصد ولی در محیط MRS آگار ۳ درصد رشد داشتند. بعد از ۴۸ ساعت در همین شرایط دمایی و محیط کشت ۵۰ درصد آن‌ها رشد کرده‌اند. با مقایسه دو شرایط دمایی ۴۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در استفاده از فرآیند تخمیر به نظر می‌رسد شرایط دمایی ۴۲ درجه سانتی‌گراد مناسب تر از دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باشد. در پژوهش‌های مختلف خواص بیوشیمیایی، فیزیومورفولوژیک، پایداری حرارتی و رشد سوش‌های ریچال ماستی در شرایط مختلف (دما، زمان و خواص آنتی باکتریایی) بررسی شده است و همگی حاکی از اختلاف رفتار این سویه‌ها در شرایط فوق می‌باشد که با نتایج این پژوهش همخوانی قابل توجهی دارد (Tkhruni, 2015 ; Fontana *et al*., 2005). وضعیت رشد کلنی‌های جدا شده در محیط‌های کشت اختصاصی مختلف لاکتیک اسید باکتری‌های جدا شده در نمودار ۳ نشان داده شده است. نتایج رشد کلنی‌ها بر محیط‌های کشت مختلف حاکی از بهترین رشد کلنی‌ها در محیط‌های Lacto Agar ، بیفیدو آگار و KF آگار بود. در بین محیط‌های براث، کلنی‌ها

به‌طور کامل در محیط MRS براث رشد کردند. در محیط کشت Milk Agar، حدود ۷۴ درصد از کلنی‌های رشد کرده بی‌رنگ و ۲۳ درصد سفید بودند. در محیط MRS ۷۰ درصد از کلنی‌های رشد کرده سفید و ۳۰ درصد از کلنی‌های رشد کرده بی‌رنگ بودند. همه کلنی‌های رشد کرده باکتری‌های لاکتیکی ریچال ماستی در محیط‌های MRS، Lacto Agar سفید بودند. باکتری‌های رشد کرده بر بیفیدو آگار ۱۰ درصد بی‌رنگ و معادل ۹۰ درصد رنگ سفید مایل به طلایی (کرمی) داشتند. یافته‌های این پژوهش با ویژگی‌های باکتری‌های لاکتیکی که گرم مثبت بوده، فاقد توانایی تشکیل اسپور، نیازمند محیط مغذی کمپلکس، شدیداً فرمانتاتیو، آئروتولرنت یا غیرهوازی و اسیددیوریک یا اسیدوفیل می‌باشند، کاملاً مطابقت داشته و نشانه تأیید باکتری‌های فوق می‌باشد.



نمودار ۲. بررسی وضعیت رشد کلنی‌های اسید لاکتیک جدا شده در محیط‌های اختصاصی

در یک پژوهش باکتری‌های لاکتیکی موجود در محصولات لبنی سنتی تخمیری را در ارمنستان و آسیای میانه بررسی نمودند و به نتایجی از جمله بررسی‌های فیزیومورفولوژیکی، بیوشیمیایی، میکروسکوپی و آنتی باکتریایی و پروبیوتیکی پرداخت و به نتایج مشابه این پژوهش دست یافت (Afrikian, 2012). در یک فراورده سنتی تخمیری به نام نونا باکتری‌ها لاکتیکی و مخمرها را جداسازی گردیده و پس از بررسی خواص فیزیومورفولوژی و شناسایی مولکولی آن‌ها پرداخت شد که با نتایج جداسازی و بررسی‌های فیزیومورفولوژیکی و شناسایی این پژوهش کاملاً مطابقت داشت (Akabanda *et al.*, 2013). چگالی نوری[1] (OD) (شاخصی که میزان رشد باکتری‌ها را در محیط‌های کشت در درجات مختلف دمایی با آن سنجش کرده‌ایم) در نمودار ۳ نشان داده شده است. چنانچه از این نمودار پیداست میزان رشد سویه‌های جدا شده از ریچال ماستی، در درجات مختلف دمایی و زمانی مقایسه گردیده و نتایج نشان می‌دهد که تغییر شرایط نگهداری سبب ایجاد اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۹۵ درصد در میزان رشد نمونه‌ها گردید بطوریکه شرایط ۳۷ درجه در ۲۴ ساعت نگهداری بیش‌ترین و شرایط دمایی ۱۵ درجه در ۲۴ ساعت کمترین عملکرد را داشته است.



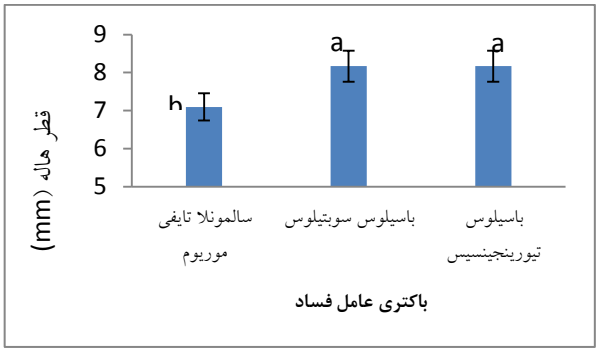
*** حروف غیر یکسان در ستون ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵ درصد می‌باشد (p<۰/۰۵).**

نمودار شماره ۳. بررسی میزان OD به عنوان شاخص رشد سوش‌های جداسازی شده از ریچال ماستی در شرایط مختلف زمانی و دمایی

بررسی خواص آنتی باکتریایی لاکتیک اسید باکتری‌ها

بررسی میزان قطر هاله به عنوان شاخص آنتی باکتریایی همه سوش‌های جداسازی شده از ریچال ماستی بر باکتری‌های عامل فساد در نمودار شماره ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد که در بین پاتوژن‌های مورد بررسی، *سالمونلا* به‌طور معنی‌داری در مقابل باکتری‌های لاکتیکی جدا شده از ریچال ماستی مقاوم است. از طرف دیگر دو پاتوژن *باسیلوس سوبتیلوس* و *باسیلوس تیورینجینسیس* دارای حساسیت بالاتری نسبت به باکتری‌های لاکتیکی بودند که این روش مشابه توسط Rahimzadeh *et al.*, (2011) نیز صورت پذیرفته است

1 . Optical Density



* حروف غیر یکسان در ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵ درصد می‌باشد (p<۰/۰۵).

نمودار شماره ۴. بررسی میزان قطر هاله به عنوان شاخص آنتی‌باکتریایی سوش های جداسازی شده از ریچال ماستی بر سه باکتری پاتوژن

در پژوهشی فعالیت آنتاگونیستی سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را در برابر عفونت *هلیکوباکتر* در شرایط آزمایشگاهی و در داخل بدن انسان مورد ارزیابی قرار دادند که نتایج نشان داد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس که جز *اسید* لاکتیک باکتری‌هاست توانست فعالیت ضد باکتریایی مطلوبی داشته باشد (Coconnier *et al*., 1998).

پژوهشگران نشان دادند که عصاره کفیر حاوی باکتری‌های لاکتیکی بر باکتری‌های *سودوموناس* خاصیت آنتی باکتریایی داشته و حتی در کنترل عفونت‌های حاصل از سوختگی، قدرت باکتریوسیدی زیادی داشته است (Rahimzadeh *et al*., 2011).

پژوهشگران در تحقیقی نشان دادند که لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس، بعد از مصرف خوراکی با تولید باکتریوسین در دهان باعث افزایش فعالیت سیستم ایمنی در افراد بالغ می‌گردد (Wolf *et al*., 2000).

در پژوهشی میلادی از آب پنیر باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتاتوم را که قدرت آنتی باکتریایی بالایی داشت را جداسازی کردند (Nithya *et al*., 2012).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر از محدود مطالعاتی است که در خصوص شناسایی تنوع میکروبی موجود در ریچال و یا ریچال ماستی صورت گرفته است. نتایج حاصل از پژوهش حاضر، بیانگر وجود سوش‌های لاکتیکی متنوع با توانایی تولید باکتریوسین قوی با قدرت تخمیر شیر و رشد در زمان‌ها و دماهای مختلف در ریچال ماستی می‌باشد. بطوریکه مایع رویی این باکترهای لاکتیکی جدا شده از ریچال ماستی توانست خواص آنتی باکتریایی مطلوبی از خود نشان دهد. لذا بنظرمی رسد از این ترکیبات می‌توان به ترتیب به عنوان مکمل یا نگه‌دارنده‌های طبیعی در صنایع غذایی دارویی، بهداشتی استفاده کرد. در نهایت استفاده از سوش‌های جداسازی شده به عنوان استارتر در صنایع تخمیری و همچنین استفاده از متابولیت‌های آن‌ها و یا خود سوش ها به عنوان نگهدارنده طبیعی یا مکمل می‌تواند راهگشای برخی از مشکلات امروزی در صنعت لبنیات باشد.

RFERENSECES

Aboutalebi, H., Heydari Nasrabadi, M., Tajabadi Ebrahimi, M., Shabani, M. & Zahedi, F.(2010). The Healing Effect of Lactobacillus plantarum Isolated from Iranian Traditional Cheese on Acetic Acid Induced Gastric Ulcer in Rats. *Razi Journal of Medical Sciences*, 17 (77), 7-16.(In Farsi)

Afrc, R. F. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, *66*(5),365-378.

Afrikian, E.(2012). Studies of lactic-acid bacteria in Armenia with emphasis on radioprotective properties. *The Environmentalist journal*, *32*(2), 256-268.

Akabanda, F., Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Glover, R. L., Nielsen, D. S. & Jespersen, L. (2013). Taxonomic and molecular characterization of lactic acid bacteria and yeasts in nunu, a Ghanaian fermented milk product.*journal of Food microbiology*, *34*(2),277-283.

Azadnia, P. & Khan Nazer, A. H. (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in tribes of Fars province. *Iranian Journal of Veterinary Research*, *10*(3),235-240.(In Farsi).

Coconnier, M. H., Lievin, V., Hemery, E. & Servin, A. L. (1998). Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro and in vivo by the human Lactobacillus acidophilus strain LB. *Applied and Environmental Microbiology journal*, *64*(11), 4573-4580.

Fontana, C., Cocconcelli, P. S. & Vignolo, G. (2005). Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *International journal of food microbiology*, *103*(2),131-142.

Haidari, Z., Ghaemi, N. & Faezie Ghasemi, M.(2007). Evaluation of bactericide activity by LAB isolated from dairy product in insitu media .*Journal bioscience of Lahijan branch*, 1(3)13-22.(In Farsi)

Hamidi, M., Mosavi Nasab. S., Ahmadi, N., basati, G., avlad, G. & zargar, M. (2013). Synthesis of antimicrobial peptides in bacteria. *journal of ilam university of medical sciences*, 20 (5) ,149-157.(In Farsi).

Hassani, M., Farajnia, S., Hesari, J. & Mossavi, M. H. (2001). Isolation and determination of

functionally important properties of two strains of lactobacillus isolated of traditional Lighvan cheese.In: food congress 18th,15-17 november.,Mashhad University, Mashhad, Iran.(In Farsi)

ISIRI., Institute of Standards and Industrial Research of Iran.(2004). ISIRI Number 4046. Milk and milk products- Yogurt- Specification and test methods,from http://www.isiri.org/portal/files/std/4046.doc

ISIRI., Institute of Standards and Industrial Research of Iran.(2009). ISIRI Number 695. Milk and milk products- Yogurt- Specification and test methods,from http://www.isiri.org/portal/files/std/695.pdf

Karimpour, F. (2014). Study of Iranian Traditional Fermented Dairy Beverage "*Richal*" and Investigation of Its Production Possibility.ph. D. dissertation, *Thesis in food bioprocessing*, University of Yeravan, Armenia.

Karimpour, F., Tkhruni, F.N., Karapetyan, K.J. & Razavi, S. H.(2013). Certain probiotic properties of lactic acid bacteria from the Iranian dairy product "Richal". *Life Science Journal*, *10*(6s),508-512.

Karimpour., F. Tkhruni, F.N., Razavi, S.H. & Karapetyan, K. J. (2011). The characteristic of microflora of iranian traditional dairy beverage.In: The First international Scientific-Research Conference of Iranian students: 16-17 September.,Yerevan University,Armenia.

Nithya, K., Senbagam, D., Senthilkumar, B., Udhayashree, N. & Gurusamy, R. (2012). Characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria and its application as a food preservative. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(6),1138-1146.

Patil, M. M., Pal, A., Anand, T. & Ramana, K.V. (2010). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from curd and cucumber. *Indian Journal of Biotechnol*ogy, *9*,166-172.

Rahimzadeh, G., Bahar, M. A., Amir Mozafari, N. & Salehi, M. (2011). Antimicrobial activity Kefir on Pseudomonas aeruginosa. *Razi Journal of Medical Sciences*, *18*(82),8-16.

Rajaram, G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B. & Saravanakumar, A. (2010). Purification and characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus lactis isolated from marine environment. *Advance Journal Food Science and Technology*, *2*(2), pp.138-144.

Tkhruni, F.N. (2015). Efficiency of metabiotics from lactic acid bacteria against pathogens. *.International Journal of Current Research*, 3(3),86-96.

Wolf, L., Erickson, K. L. & Hubbard, N. (2000). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Journal Nutrition*, *130*(2),403-409.