مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال شانزدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰، صفحات ۱۴۲-۱۳۳

جداسازی و شناسایی سویه‌های لاکتوباسیل از پنیر محلی بهبهان و بررسی ویژگی‌های تکنولوژیکی و ضدمیکروبی آن‌ها علیه پاتوژن‌های شاخص غذایی

بهروز علیزاده بهبهانی[۱]، محمد نوشاد[۲]

۱- نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
پست الکترونیکی: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir
۲- استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۴/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۹/۷/۱۴

چکیده

سابقه و هدف: امروزه کاربرد باکتری‌های اسید لاکتیک در صنعت غذا جهت ایجاد اثرات سلامتی‌بخش رو به گسترش است. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک از پنیر محلی شهرستان بهبهان و همچنین ارزیابی ویژگی‌های تکنولوژیکی و ضدمیکروبی آن‌ها بود.

مواد و روش‌ها: باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی تا سطح جنس شناسایی و پس از گروه‌بندی بر اساس نمایهٔ تخمیر کربوهیدرات، شناسایی با استفاده از روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA انجام پذیرفت. آزمون‌های تولید اسید، فعالیت اتولیتیکی و لیپولیتیکی جهت بررسی ویژگی‌های تکنولوژیکی سویه‌ها انجام پذیرفت. در نهایت فعالیت ضدمیکروبی سویه‌ای که بهترین پاسخ را نسبت به آزمون‌های تکنولوژیکی از خود بروز داد، علیه باکتری‌های بیماری‌زای شاخص غذایی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* پنیر محلی شهرستان بهبهان متعلق به ۵ باکتری، *لاکتوباسیلوس ساکی*، *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس آگیلیس*، *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* بود. توانایی کاهش pH توسط در زمان‌های h ۳، ۶ و ۲۴ پس از شروع تلقیح، در دمای °C ۳۰ انجام شد. به جز باکتری *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* که طی ۳ ساعت کمتر از ۰/۴ واحد کاهش pH ایجاد نمودند بقیه سویه‌ها توانایی تولید اسید مطلوبی در زمان کم از خود نشان دادند. بالاترین میزان تولید اسید مربوط به سویه *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* با تغییر ۰/۶۶ واحد در pH طی ۳ ساعت تخمیر (دمای °C ۳۰) مشاهده گردید. تمامی سویه‌ها فعالیت اتولیتیکی مطلوبی از خود بروز دادند. طبق نتایج به دست آمده، ۴ سویه فعالیت لیپولیتیکی نشان دادند که بیشترین فعالیت لیپولیتیکی متعلق به *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* و کمترین مقدار متعلق به *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* بود. نتایج آزمون ضدمیکروبی نشان داد سوپرناتانت اسیدی و خنثی شده باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* بر تمامی سویه‌های بیماری‌زا اثر داشت و *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب مقاوم‌ترین و حساس‌ترین سویه بودند.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به‌دست آمده سویه *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* دارای بهترین ویژگی‌های تکنولوژیکی و ضدمیکروبی جهت استفاده به‌عنوان کشت الحاقی در صنایع لبنی می‌باشد.

واژگان کلیدی: پنیر، *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*، فعالیت اتولیتیکی، فعالیت لیپولیتیکی، فعالیت ضدمیکروبی

• مقدمه

پنیر محصول تغلیظ شده‌ای از ترکیبات مغذی شیر است که نقش مهمی در رژیم غذایی انسان ایفا می‌کند. پنیر یکی از پرمصرف‌ترین فراورده‌های لبنی می‌باشد به‌طوریکه همه روزه و در سنین مختلف در همه جای دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرد. پنیر دارای ارزش تغذیه‌ای بالا و مقادیر فراوانی از پروتئین‌های قابل هضم است زیرا در حین فرآیند رسیدن، برخی از پروتئین‌ها به پپتیدها و اسیدهای آمینه پایه‌ای شکسته می‌شود (۱). اگرچه محصولات لبنی به عنوان حامل مناسبی جهت انتقال باکتری‌های اسید لاکتیک به محیط روده انسان در نظر گرفته می‌شوند اما موانع تکنولوژیکی از قبیل

مقدار نمک فراورده، نوع بسته‌بندی، نوع سویه میکروبی مورد استفاده، مقاومت میکروارگانیسم نسبت به شرایط مختلف محیطی و غیره می‌تواند در راندمان این انتقال نقش مهمی ایفا کند. پنیر نسبت به سایر فراورده‌های لبنی دارای ویژگی‌های خاص و ویژه‌ای از جمله اسیدیته قابل تیتر پایین‌تر، pH بالاتر، محتوی چربی بیشتر، ظرفیت بافری بالاتر و بافت متراکم‌تر می‌باشد. ظرفیت بافری بالا یک ویژگی مثبت برای باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد زیرا باعث جلوگیری از تنش اسیدی در شرایط دستگاه گوارش انسان می‌شود. علاوه بر این، بافت متراکم پنیر و محتوای چربی بالای آن باعث محافظت از میکروارگانیسم‌های موجود در آن در طول مسیر گوارش می‌گردد (۲). عواملی مانند نوع شیر به کار رفته در فرایند تولید پنیر، روش مورد استفاده برای تولید آن، اعمال یا عدم اعمال پاستوریزاسیون شیر، استارتر (آغازگر) و گذراندن یا عدم گذراندن دوران رسیدگی بر ترکیبات مغذی و کیفیت پنیر تاثیرگذار است (۳). در تولید پنیرهای سنتی حضور باکتری‌های اسید لاکتیک غیرآغازگر متنوعی مشاهده می‌شود که این موضوع اهمیت شناسایی دقیق فلور لاکتیکی میکروارگانیسم‌های عامل در رسیدن پنیرهای سنتی جهت دست یابی و طراحی کشت میکروبی ثانویه برای تولید صنعتی انواع پنیرها را مشخص می‌نماید. باکتری‌های اسیدلاکتیک گستردگی فراوانی در طبیعت داشته و براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی (ریخت‌شناسی) و مسیر تخمیر که از طریق آن گلوکز را مورد استفاده قرار می‌دهند، تقسیم‌بندی می‌شوند. امروزه بیش از ۲۰ جنس برای این خانواده وسیع و بزرگ در نظر گرفته شده است که مهمترین آن‌ها *لوکونوستوک*، *لاکتوباسیلوس*، *استرپتوکوکوس*، *لاکتوکوکوس* و *پدیوکوکوس* می‌باشند. این باکتری‌ها در فراورده‌های تخمیری سنتی به وفور یافت می‌شوند و همچنین در فرایندهای تخمیر کنترل شده مواد غذایی به عنوان کشت آغازگر یا کشت همراه مورد استفاده قرار می‌گیرند. این میکروارگانیسم‌ها به دلیل تبدیل قندهای قابل تخمیر به اسیدهای آلی، اتانول و سایر متابولیت‌هایی که پتانسیل ضدمیکروبی دارند، شرایط نامساعد برای رشد میکروارگانیسم‌هایی که به صورت بالقوه پاتوژن یا عامل فساد هستند، ایجاد می‌کنند. برخی از سویه‌های اسید لاکتیک که از موادغذایی تخمیری جداسازی شده‌اند، به علت مقاومت نسبت به شرایط اسیدی معده، مقاومت به نمک‌های صفراوی، مقاومت به آنزیم‌های لیز کننده دستگاه گوارش، چسبیدن به سلول‌های اپی‌تلیوم روده میزبان و جلوگیری از رشد یا فعالیت باکتری‌های پاتوژن (بیماری‌زا) به عنوان باکتری پروبیوتیک استفاده می‌شوند. باکتری‌های پروبیوتیک میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت استفاده به میزان مناسب، رسیدن به روده بزرگ و کلونیزاسیون (رشد و تکثیر)، اثرات مثبتی را در میزبان ایجاد می‌کنند (۵، ۴). فعالیت آنتاگونیستی (بازدارندگی) باکتری‌های اسید لاکتیک دلایل گوناگونی از جمله رقابت برای مصرف مواد مغذی، تولید متابولیت‌های بازدارنده مانند اسیدهای آلی، باکتریوسین‌ها (نسل جدیدی از پپتیدهای ضدمیکروبی)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و غیره دارد (۶). بیشتر باکتری‌های پروبیوتیک‌ها منشاء روده‌ای دارند و متعلق به جنس‌های *بیفیدوباکتریوم* و *لاکتوباسیلوس* هستند. اگرچه برخی از سوش‌های متعلق به جنس‌های *لاکتوکوکوس*، *انتروکوکوس*، *پدیوکوکوس* و مخمر *ساکارومایسز* نیز با توجه به اثر آن‌ها بر سلامت مصرف‌کنندگان، به عنوان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک مورد توجه قرار گرفته‌اند. باکتری‌های پروبیوتیک دارای اثرات سلامتی‌بخش فراوانی هستند که از جمله این فواید می‌توان به تحریک و تقویت سیستم ایمنی، بهبود متابولیسم لاکتوز، کاهش کلسترول سرم، ویژگی‌های ضد جهش‌زایی، فعالیت ضد‌سرطانی (مخصوصا برای سرطان کولون یا روده بزرگ)، جلوگیری از ابتلا به اسهال، بهبود التهاب‌های روده و سرکوب عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* اشاره نمود (۸، ۷). پتانسیل تکنولوژیکی به مجموعه ویژگی‌های اطلاق می‌شود که زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط مختلف فراوری و هچنین ایجاد عطر و طعم مطلوب در ماده غذایی را مورد بررسی قرار می‌دهد. استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک در کشت‌های آغازگر تجاری به ویژگی‌های تکنولوژیکی و متابولیکی مثل تولید اسید، فعالیت پروتئولیتیکی، فعالیت لیپولیتیکی میزان اتولیز شدن، تولید باکتریوسین، تولید اگزوپلی ساکاریدها و مقاومت به باکتریوفاژ وابسته است (۹).

تاکنون پژوهش‌های مختلفی راجع به شناسایی فلور میکروبی پنیرهای سنتی و ویژگی‌های آن‌ها در سرتاسر دنیا صورت گرفته است. به عنوان مثال، ایزدی مهر و همکاران (۱۳۹۷)، ویژگی‌های تکنولوژیکی و ضدمیکروبی سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* جداسازی شده از پنیر سنتی لیقوان را مورد بررسی قرار دادند (۱۰). کفیلی و علی نسایی (۱۳۹۶)، فلور میکروبی پنیر سنتی تالشی را شناسایی کردند (۱۱). احسانی و همکاران (۱۳۹۳) سویه‌های لاکتوباسیلوس پنیرهای سنتی آذربایجان غربی را جداسازی و شناسایی نمودند (۱۲). حسنی و همکاران (۱۳۹۰) خواص گونه‌های لاکتوباسیل غالب در پنیر سنتی لیقوان را ارزیابی کردند (۱۳). Abdi و همکاران

(۲۰۰۶)، فلور لاکتیکی غالب جدا شده از پنیر لیقوان را لاکتوباسیلوس‌های مزوفیل عنوان نمودند (۱۴). Ghotbi و همکاران (۲۰۱۰)، گزارش کردند که سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* گونه‌های غالب جدا شده از پنیر لیقوان می‌باشد (۱۵). طبق بررسی صورت گرفته تاکنون پژوهش مشابه‌ای در مورد شناسایی فلور میکروبی پنیرهای محلی شهرستان بهبهان صورت نگرفته است، لذا هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی سویه‌های لاکتوباسیلوس ایزوله شده از پنیر محلی شهرستان بهبهان و همچنین بررسی پتانسیل تکنولوژیکی و ضدمیکروبی آن‌ها بود.

• مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌های پنیر محلی و آزمون‌های مبتنی بر کشت: ۸ نمونه پنیر محلی از مناطق مختلف شهرستان بهبهان تحت شرایط سترون (با رعایت اصول سترونی در ظروف استریل (اتوکلاو شده در دمای ۱۲۱ °C به مدت min ۱۵)) و حفظ زنجیره سرد (۴ °C) جهت جلوگیری از تغییر در فلور میکروبی و نیز آلودگی ثانویه، جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از همگن‌سازی توسط دستگاه استومیکر (Interscience، St. Nom، فرانسه) تا رقت مناسب رقیق‌سازی شده، روی محیط MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) آگار کشت داده و سپس در دمای ۳۷ °C به مدت ۴۸ h گرمخانه‌گذاری صورت پذیرفت (۱۶). کلنی‌هایی که از نظر ویژگی‌های ظاهری با هم متفاوت بودند از طریق مشاهده مورفولوژیکی زیر میکروسکوپ، رنگ‌آمیزی گرم و آزمون کاتالاز غربالگری اولیه شدند. آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل رشد در دمای‌های °C ۱۰، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pHهای ۴/۴ و ۹/۶، توانایی رشد در غلظت ۶/۵ درصد نمک و توانایی تولید گاز جهت شناسایی باکتری‌ها تا سطح جنس انجام پذیرفت. جهت گروه‌بندی سویه‌ها از آزمون تخمیر کربوهیدرات استفاده شد. برای انجام تست‌های تاییدی تخمیری، از ده نوع قند استفاده گردید که شامل: گلوکز، ساکارز، گالاکتوز، فروکتوز، لاکتوز، مالتوز، سوربیتول، رافینوز، ملی‌بیوز و مانیتول در محیط پایه فنل رد براث (کیولب، کانادا) با فرمول g/L ۱۰ پپتون پروتئاز، g/L ۱ عصاره گوشت، g/L ۵ کلرید سدیم و g/L ۰/۰۱۸ فنول رد به عنوان معرف و ۱ درصد غلظت نهایی، قندهای مورد بررسی بودند. محیط کشت فنل رد براث پایه از آن جهت که فاقد هر گونه قندی است، در نتیجه فاقد هرگونه خطا در انجام تست تخمیر قند خواهد بود. لوله‌های مورد آزمون به مدت ۳ الی ۵ روز در گرمخانه °C ۳۷ قرار داده شدند. محیط کشت فنل رد براث در حالت معمولی رنگ نارنجی متمایل به قرمز دارد. اگر پس از اضافه نمودن محلول قند و تلقیح باکتری (Colony Forming Unit/mL $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$) و سپس گرمخانه گذاری رنگ محیط کشت به زرد تغییر کرد، یعنی تخمیر انجام شده است (۱۶).

جداسازی و شناسایی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* بر اساس روش مولکولی: بعد از گروه‌بندی باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از آزمون تخمیر کربوهیدرات، از هر گروه یک سویه انتخاب، استخراج DNA ژنومی انجام و سپس واکنش PCR با استفاده از پرامرهای 27FY (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') و 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') و مطابق برنامه دمایی زیر انجام گرفت.

این برنامه دمایی شامل:

۱. فعال‌سازی: ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، یک سیکل

۲. گسترش که خود شامل سه مرحله واسرشته‌سازی (۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد)، اتصال پرایمر (۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد) و توسعه (۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد)، ۳۵ سیکل

۳. گسترش نهایی: ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، یک سیکل

بعد از انجام PCR و مشاهده باندها روی ژل، قطعات تکثیر یافته جهت خوانش توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند (۱۶).

آزمون‌های تکنولوژیکی

ارزیابی قابلیت تولید اسید: ابتدا سویه‌ها در محیط کشت MRS براث فعال شدند و سپس به میزان ۱ درصد در شیر اسکیم (پس‌چرخ) بازسازی شده که حاوی ۰/۳ درصد عصاره مخمر و ۰/۲ درصد گلوکز بود، تلقیح گردید. لوله آزمایش در دمای ۳۰ °C گرمخانه‌گذاری شده و تغییرات pH با استفاده از pH متر Lab 827 (متروم، سوئیس) مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

ارزیابی فعالیت اتولیتیکی: ابتدا تمامی سویه‌ها در محیط کشت MRS براث، در دمای ۳۷ °C و به مدت ۱۸ h گرمخانه‌گذاری شدند. سپس سانتریفیوژ (HK236، Hermle، آلمان) در دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ min و در دمای ۴ °C انجام پذیرفت. رسوب سلولی ایجاد شده بعد از دو بار شست‌وشو، در بافر فسفات ۲۰ mM، pH=۷ سوسپانس شده تا کدورتی

معادل ۱ در طول موج ۶۰۰ nm در دستگاه اسپکتروفتومتر (WPA Lightwave، Biochrom Ltd، Cambridge، انگلیس) ایجاد نماید. محیط سلولی ایجاد شده در معرض سیکل انجمادی در دمای ۲۰- °C به مدت ۲۴ h و خروج از انجماد قرار گرفته و سپس در دمای ۳۷ °C درجه سانتی‌گراد گرم-خانه گذاری انجام شد (۱۹، ۱۸). میزان فعالیت اتولیتیکی به صورت کاهش در میزان جذب در ۶۰۰ nm نانومتر و براساس معادله ۱، مورد بررسی قرار گرفت.

معادله (۱):

$$\%\text{فعالیت اتولیتیکی} = \left[\frac{Abs_0 - Abs_t}{Abs_0}\right] \times ۱۰۰$$

جذب اولیه

جذب اندازه گیری شده بعد از گرمخانه‌گذاری Abs_t=

ارزیابی فعالیت لیپولیتیکی: سویه‌ها در دمای ۳۷ °C کشت شبانه شدند، سپس در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۲ min سانتریفیوژ شدند و محلول رویی برای ادامه آزمایش جداسازی شد. جهت سنجش فعالیت لیپولیتیکی سویه‌ها، ابتدا ۱ mL محلول آنزیمی به ۳ mL بافر فسفات ۰/۲ M و ۱ mL محلول کلسیم کلرید ۰/۱ M مولار اضافه شد. در مرحله بعد ۵ mL امولسیون سوبسترا شامل روغن زیتون و پلی‌وینیل الکل با نسبت ۱ به ۳ (روغن/الکل) به محلول قبلی اضافه گردید. سپس ۱۵ min در دمای محیط قرار داده شد و بعد از آن ۲۰ mL محلول هم حجم استن-اتانول برای خاتمه واکنش اضافه گردید تا امولسیون شکسته شود. در مرحله بعد ۳ قطره فنل فتالئین ۱ درصد اضافه و با سود (۰/۵ نرمال) تیتر گردید (حجم سود مصرفی V_1 در نظر گرفته شد). تمام مراحل برای نمونه شاهد نیز انجام پذیرفت (به جز افزودن محلول آنزیمی) و سود مصرفی در تیتراسیون نمونه شاهد V_2 در نظر گرفته شد (۲۰، ۱۹). طبق معادله ۲، فعالیت آنزیم در هر mL محاسبه شد (t مدت زمان آزمایش بر حسب min است و N نرمالیته سود (۰/۱ M) مصرفی جهت تیتراسیون):

معادله (۲):

$$U = \left[\frac{N \times (V_1 - V_2)}{\mathrm{t}}\right] \times ۱۰۰۰$$

فعالیت ضدمیکروبی: در این پژوهش از باکتری‌های پاتوژن *اشرشیا کلی* (ATCC 35218)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853)، *باسیلوس سوبتیلیس* (ATCC 6633) و *کلبسیلا پنومونیا* (ATCC 18833) جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های اسید لاکتیک استفاده شد. سویه‌های اسیدلاکتیک در محیط کشت MRS براث، در دمای ۳۷°C و به مدت ۱۸ h ساعت انکوبه شدند. سپس سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ min و در دمای ۴ °C انجام پذیرفت. بخشی از سوپرناتانت فاقد سلول با همان pH ابتدایی جهت سنجش اثر ضدمیکروبی مورد استفاده قرار گرفت. جهت خنثی کردن اثر اسیدهای آلی، با استفاده از سدیم هیدروکسید ۵ M، pH بخش دیگر سوپرناتانت روی ۵/۵ تنظیم شد. سپس هر دو سوپرناتانت جهت اطمینان از عاری بودن از باکتری و آلودگی، فیلتر (فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون) شده و لیوفیلیزه (خشک کردن انجمادی) گردید. نمونه‌های خشک شده در ۳ mL آب مقطر استریل حل و فعالیت ضدمیکروبی آن با روش انتشار در اگار مورد سنجش قرار گرفت. باکتری‌های پاتوژن ذکر شده (با غلظت نیم مک فارلند)، روی محیط مولر هنیتون آگار (مرک، آلمان) کشت گردید. سپس چاهک‌هایی با قطر ۶/۸ mm و با استفاده از انتهای پی‌پت استریل در پلیت‌ها ایجاد شد و عصاره باکتری (۱۱۰ µl) به چاهک‌ها تزریق گردید. بعد از گرمخانه-گذاری به مدت ۴۸ h ساعت در دمای ۳۷ °C میانگین قطر هاله عدم رشد در اطراف هر چاهک بر حسب mm اندازه‌گیری شد (۲۲، ۲۱).

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده ها به روش تجزیه واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار (Statistical package for the social sciences) SPSS نسخه ۲۲ انجام گردید. برای مقایسه میانگین ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

• یافته‌ها

شناسایی سویه‌های *لاکتوباسیلوس*: بعد از گروه‌بندی باکتری‌های ایزوله شده از پنیر محلی شهرستان بهبهان براساس نمایهٔ تخمیر کربوهیدرات، ۵ گروه مختلف ایجاد شد. از هر گروه یک باکتری به نمایندگی از تمامی اعضای آن گروه انتخاب و استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) روی آن انجام پذیرفت. بعد از مقایسه توالی‌های خوانش شده با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI، ۵ سویه متعلق به باکتری‌های *لاکتوباسیلوس ساکی*، *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس آگیلیس*، *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* بودند.

ویژگی‌های تکنولوژیکی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس*: توانایی کاهش pH توسط سویه‌های مختلف اسید لاکتیک در زمان‌های ۳ h، ۶ و ۲۴ ساعت پس از شروع تلقیح، در شکل ۱، نشان داده شده است. در این پژوهش به جز باکتری

لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* که طی h ۳ کمتر از ۰/۴ واحد کاهش pH ایجاد نمودند بقیه سویه‌ها توانایی تولید اسیدیته مطلوبی در زمان کم از خود نشان دادند. بالاترین میزان تولید اسید مربوط به سویه *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* با تغییر ۰/۶۶ واحد در pH مشاهده گردید. همچنین *لاکتوباسیلوس ساکی* نیز با کاهش ۰/۶۱ واحدی دارای فعالیت اسیدیفیکاسیون مطلوب می‌باشد.

فعالیت اتولیتیکی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* پنیر محلی به صورت کاهش درصد جذب در طول موج ۶۰۰ nm اندازه-گیری شد (شکل ۲). مطابق با این تعریف *لاکتوباسیلوس آگیلیس* و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* جزء گروه نسبتا خوب و بقیه سویه‌ها جزء گروه خوب قرار می‌گیرند.

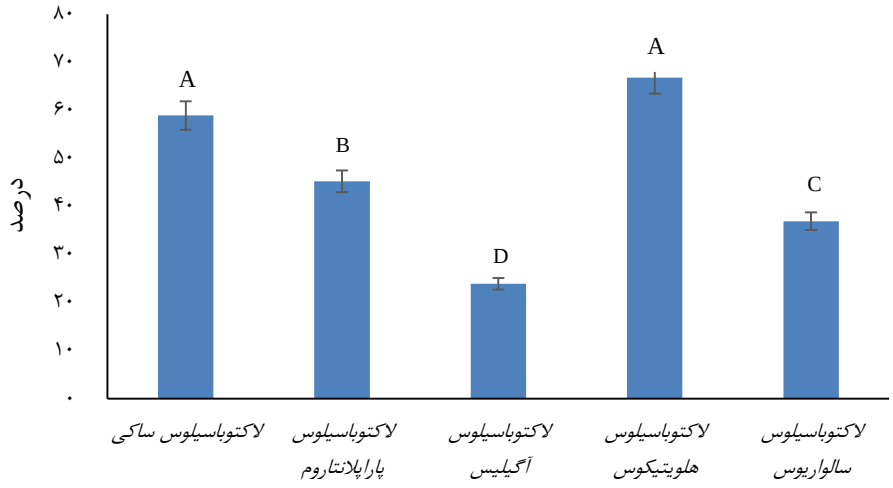
فعالیت لیپولیتیکی به عنوان یک فرآیند مهم در توسعه عطر و طعم محصولات لبنی مخصوصا پنیر در نظر گرفته می‌شود. فعالیت لیپولیتیکی سویه‌ها در جدول ۱، آورده شده است. طبق نتایج به دست آمده بیشترین فعالیت لیپولیتیکی متعلق به *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* و کمترین مقدار متعلق به *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* می‌باشد.

جدول ۱. فعالیت لیپولیتیکی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* جدا شده از پنیر محلی بهبهان

باکتری‌های اسید لاکتیک	فعالیت پروتئولیتیکی (Unit/ml)
لاکتوباسیلوس ساکی	۱۰/۵±۰/۳۲
لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم	۷/۸±۰/۱۸
لاکتوباسیلوس آگیلیس	۶/۴±۰/۱۲
لاکتوباسیلوس هلویتیکوس	۱۳/۷±۰/۲۵
لاکتوباسیلوس سالیواریوس	-

(-): فعالیت پروتئولیتیکی مشاهده نشد.

شکل ۱. تغییرات ΔpH ایجاد شده توسط باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* طی زمان‌های h ۳، ۶ و ۲۴ از شروع گرمخانه‌گذاری



شکل ۲. نتایج مربوط به فعالیت اتولیتیکی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* جدا شده از پنیر محلی بهبهان

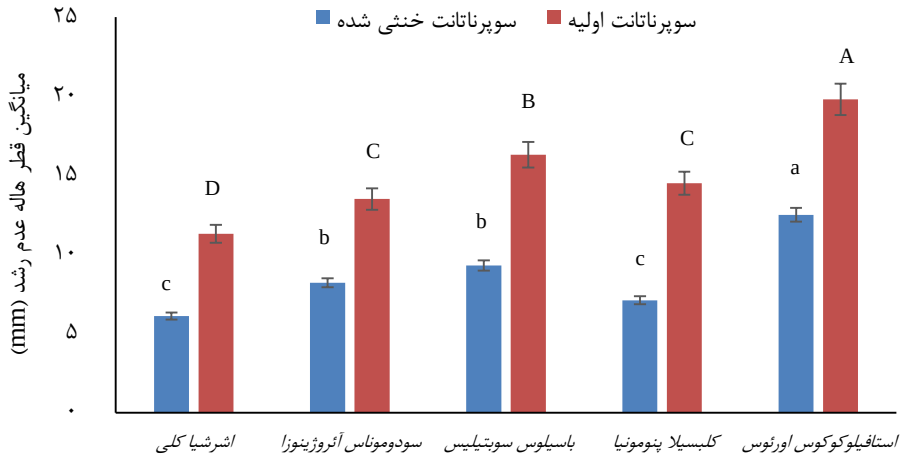
✓ حروف غیر مشابه بزرگ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار فعالیت اتولیتیکی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* در سطح ۵ درصد ($p<0/05$) است.

فعالیت ضدمیکروبی: باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* بهترین پاسخ‌ها را نسبت به آزمون‌های تکنولوژیکی از خود نشان داد. لذا این سویه انتخاب و فعالیت ضدمیکروبی آن علیه پاتوژن‌های شاخص بیماری‌زا مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۳). نتایج نشان داد *اشرشیا کلی* مقاوم‌ترین سویه نسبت به عصاره‌های اسیدی و خنثی شده *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* می‌باشد. به‌طوری که سوپرناتانت (فاز فوقانی به دست آمده بعد از فرآیند سانتریفوژ کردن عصاره) خنثی شده این باکتری هاله‌ای به قطر ۶/۱ mm و سوپرناتانت اولیه یا اسیدی این باکتری نیز هاله‌ای ۱۱/۳ mm روی محیط کشت ایجاد نمود. *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز به عنوان حساس‌ترین سویه بود؛ به‌طوری که سوپرناتانت خنثی شده *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* هاله ۱۲/۵ mm و سوپرناتانت اولیه هاله mm ۱۹/۸ روی محیط کشت رشد یافته این باکتری ایجاد نمود.

• بحث

در این پژوهش فلور میکروبی (گونه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک) پنیر محلی شهرستان بهبهان از نظر وجود باکتری‌های جنس *لاکتوباسیلوس* مورد بررسی قرار گرفت و سپس ویژگی‌های تکنولوژیکی آن‌ها از قبیل توانایی تولید اسید، فعالیت اتولیتیکی و لیپولیتیکی تعیین شد و در نهایت فعالیت ضدمیکروبی باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* که بهترین پاسخ را در آزمون‌های تکنولوژیکی ثبت نموده بود، علیه پاتوژن‌های شاخص غذایی مورد بررسی قرار گرفت.

از آنجایی که کشت‌های مکمل و همراه نقش به سزایی در ایجاد عطر و طعم در پنیر دارند لذا شناسایی این دسته از باکتری‌ها جهت کاربردهای صنعتی، مورد علاقه روزافزون پژوهشگران قرار گرفته است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یکی از روش‌های قدرتمند در شناسایی انواع باکتری‌ها بر اساس تکثیر نواحی ژنتیکی محافظت شده است که علاوه بر سرعت بالا، امکان شناسایی تعداد بسیاری از باکتری‌ها در مدت زمان کم، اقتصادی بودن و صحت بالای نتایج، فاقد معایب مرسوم در روش‌های شناسایی مبتنی بر کشت می‌باشد (۲۳). کفیلی و علی نسایی (۱۳۹۶)، به شناسایی و بررسی باکتری‌های اسید لاکتیک غیر آغازگر در پنیر رسیده تالشی پرداختند. نتایج نشان داد سویه‌های غالب در این پنیر سنتی شامل *لاکتوباسیلوس پارا‌پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس ساکی*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و در میان لاکتوکوکسی‌ها، گونه‌های *استرپتوکوکوس گالولیتیکوس*، *انتروکوکوس فکالیس* و *فاسیوم* غالب بودند که غالب‌ترین سویه متعلق به *لاکتوباسیلوس پارا‌پلانتاروم* بود (۱۱). احسانی و همکاران (۱۳۹۳)، اقدام به جداسازی و شناسایی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* در پنیرهای سنتی استان آذربایجان غربی نمودند. نتایج نشان داد این باکتری‌ها متعلق به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس آگیلیس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* بودند (۱۲). باکتری‌های اسید لاکتیک در پنیرهای رسیده به تعداد بالا یافت می‌شوند و نقش عمده‌ای را در رسیدن پنیر از طریق واکنش‌های بیوشیمیایی ایفا کنند. در پنیرهای تهیه شده با شیر خام معمولا باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* گونه‌های غالب هستند، زیرا این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند شرایط نامساعد نیز، به رشد خود ادامه دهند و با دارا بودن فعالیت پروتئولیتیکی قوی، نقشی مهم در ایجاد ویژگی‌های حسی در پنیر ایفا می‌کنند (۲۴).



شکل ۳. اثر ضد میکروبی سوپرناتانت اولیه و خنثی شده باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* علیه باکتری‌های شاخص بیماری‌زا

حروف غیر مشابه کوچک نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد ($p<۰/۰۵$) میان سوپرناتانت خنثی شده باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* علیه باکتری‌های شاخص بیماری‌زا است.

حروف غیر مشابه بزرگ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد ($p<۰/۰۵$) میان سوپرناتانت اولیه باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* علیه باکتری‌های شاخص بیماری‌زا است.

توانایی تولید اسید یکی از ویژگی‌های مهم باکتری‌های اسید لاکتیک است. هم از جنبه تکنولوژیکی این موضوع باعث ایجاد عطر و طعمی خاص و جدید در محصول می‌شود و هم از جنبه ایمنی غذایی، با تولید اسید در زمانی کوتاه و غالب شدن باکتری در محیط، باعث جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن و ایجاد بیماری می‌گردد. Nieto-Aribas و همکاران (۲۰۰۹)، تعریف دیگری جهت طبقه‌بندی باکتری‌های اسید لاکتیک در میزان تولید اسید ارائه نمودند. بر طبق این تعریف و بر اساس میزان تولید اسید توسط باکتری‌ها طی ۲۴ ساعت، ۳ گروه ایجاد می‌شوند: آن دسته از باکتری‌هایی که ظرفیت اسیدی بالا با کاهش بیش از ۲ واحد pH دارند و به‌عنوان ظرفیت اسیدی بالا در نظر گرفته می‌شوند؛ آن‌هایی که قابلیت کاهش pH در محدوده ۱/۵-۲ واحد داشته و دارای ظرفیت اسیدی متوسط هستند وگروه آخر، آن دسته از باکتری‌هایی هستند که ظرفیت تولید اسید کمی دارند و کمتر از ۱/۵ واحد کاهش در pH محیط ایجاد می‌کنند (۲۵). مطابق با این تعریف *لاکتوباسیلوس ساکی* و *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* جز گروه ظرفیت اسیدی بالا و بقیه باکتری‌ها جز گروه ظرفیت اسیدی متوسط قرار دارند. حسنی و همکاران (۱۳۹۰)، خواص تکنولوژیکی گونه‌های *لاکتوباسیل* غالب در پنیر سنتی لیقوان را مورد بررسی قرار داده و بیان نمودند تمامی سویه‌ها بعد از ۶ ساعت از زمان شروع تخمیر pH را از ۰/۱ تا ۰/۶۲ تغییر دادند که سرعت تولید اسید نسبتا پایینی محسوب می‌شود (۱۳). دعوتی و زیبایی (۱۳۹۶)، فلور لاکتیکی دوغ شیر شتر تک کوهانه ایرانی را تعیین و سپس ویژگی‌های تکنولوژیکی آن‌ها را مورد بررسی قرار دادند. نتاج پژوهش آن‌ها نشان داد تمامی سویه‌های *لاکتوباسیلوس پنتوسوس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس برویس*، *انتروکوکوس لاکتیس* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* توانایی ۰/۴ واحد کاهش pH بعد از ۳ ساعت گرم‌خانه گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد را داشتند و بیشترین میزان کاهش pH متعلق به باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بود که بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری توانست ۳/۹۱ واحد کاهش در pH ایجاد کند. یک باکتری با قدرت تخمیر مناسب باید بتواند در دمای ۳۰ °C و طی مدت ۳ h تخمیر ΔpH=۰/۴ ایجاد کند. پتانسیل اتولیتیکی یک ویژگی مطلوب در ارتباط با باکتری‌های اسیدلاکتیک است که منجر به انتشار آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز داخل سلولی که در تشکیل عطر و طعم محصولات لبنی می‌تواند مؤثر باشد، می‌گردد (۲۶). توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک در شدت اتولیز به این شکل طبقه‌بندی می‌شوند: صفر-۲۲: ضعیف؛ ۲۴-۳۴: نسبتا خوب؛ ۳۵-۶۶: خوب. ایزدی‌مهر و همکاران (۱۳۹۷)، به بررسی ویژگی‌های تکنولوژیکی و ضد میکروبی نژادهای *انتروکوکوس فاسیوم* زیر گونه *فاسیوم* غیر بیماری‌زا جدا شده از پنیر لیقوان پرداختند. نتایج فعالیت اتولیتیکی نشان داد تمام سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* مورد مطالعه فعالیت مناسبی داشته و بیشترین میزان فعالیت اتولیتیکی ۷۰/۵۵ درصد گزارش شد (۱۰). Piraino و همکاران (۲۰۰۸)، گزارش کردند بالاترین سرعت اتولیز شدن که حدود ۰/۲۵ OD/h می‌باشد و بیشترین میزان اتولیز شدن که تا ۷۰ درصد OD می‌باشد، متعلق به لاکتوکوکسی و باکتری‌های اسید لاکتیک غیر استارتری بود. همچنین آن‌ها تفاومت معنی‌داری ($p<0/05$) در اختلاف فعالیت اتولیتیکی بیون سویه‌های *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* مشاهده نکردند (۲۷). توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک در لیز کردن سلول‌های میزبان و خروج از آن‌ها یک ویژگی مطلوب در رسیدن پنیر بشمار می‌رود. پتانسیل اتولیتیکی یک مشخصه وابسته به سویه بوده و برای هر باکتری باید ارزیابی گردد. آنزیم‌هایی که طی لیز شدن از باکتری خارج می‌شود نقش کلیدی در تشکیل اسیدهای آمینه شرکت کننده در عطر و طعم ایفا می‌کند. Hannon و همکاران (۲۰۰۲)، در بررسی که بر پنیرهای مختلف و فعالیت اتولیتیکی سویه‌های شرکت کننده در فلور لاکتیکی آن‌ها داشتند به این نتیجه رسیدند که یکی از راه‌های سرعت بخشیدن تولیدات محصولات لبنی و مخصوصا در فراورده پنیر، استفاده از کشت الحاقی است که انتخاب سویه‌های کشت الحاقی باید بر اساس نمایهٔ آنزیم‌ها و ویژگی‌های اتولیتیکی آن‌ها انجام پذیرد (۲۸).

پتانسیل لیپولیتیکی یک سویه به عنوان یک ویژگی مهم در توسعه عطر و طعم و بافت محصولات لبنی از جمله پنیر در نظر گرفته می‌شود. در این فرایند، آنزیم لیپاز، باعث هیدرولیز تری‌گلیسریدها شده و ترکیبات مؤثر در عطر و طعم مانند متیل کتون، استرها و لاکتون‌ها تولید می‌شوند. فعالیت لیپولیتیکی در برخی از فراورده‌های غذایی مانند پنیرهای ایتالیایی و رگه آبی مطلوب می‌باشد زیرا هیدرولیز جزئی چربی شیر منجر به افزایش و بهبود عطر و طعم می‌گردد بدون اینکه باعث ایجاد طعم تلخ شود اما در برخی دیگر از محصولات از قبیل شیرهای تخمیری این فرایند نامطلوب به شمار می‌آید (۲۹). در این پژوهش مشخص شد تمامی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* به جز *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* دارای فعالیت لیپولیتیکی در گستره ۶/۴-۱۳/۷ واحد فعالیت

آنزیم لیپاز در میلی‌لیتر می‌باشند. دعوتی و همکاران (۱۳۹۶)، فعالیت لیپولیتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از شیر شتر را مورد بررسی قرار دادند و بیان نمودند بیشترین فعالیت لیپولیتیکی متعلق به باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* و *لاکتوباسیلوس برویس* می‌باشد (۲۶). Ukwuru و همکاران (۲۰۱۴)، فعالیت کمی آنزیم لیپاز را در باکتری‌های مورد آزمون با روش تیتراسیون مورد بررسی قرار داده و گزارش نمود *لاکتوباسیلوس کرموریس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *انتروکوکوس فکالیس* با فعالیت لیپولیتیکی در گستره ۱۳/۳۳-۲۰ واحد فعالیت آنزیم لیپاز در میلی‌لیتر دارای بیشترین فعالیت لیپولیتیکی هستند (۳۰).

امروزه به کارگیری باکتری‌های پروبیوتیک در پیشگیری و درمان بیماری‌ها و همچنین ارتقاء سلامتی انسان امری پذیرفته به حساب می‌آید. باکتری‌های پروبیوتیک نه تنها به عنوان محرک رشد، بلکه برای تحریک دستگاه ایمنی و پیشگیری از ابتلا به بسیاری از بیماری‌ها مخصوصا بیماری‌های عفونی به کار گرفته می‌شوند (۳۱). یکی از اهداف این پژوهش بررسی اثر ضدمیکروبی باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* علیه پاتوژن‌های شاخص بیماری‌زا بود تا وضعیت ضدمیکروبی آن در جهت کابردهای بعدی مشخص گردد. سوپرناتانت اسیدی و همینطور خنثی شده این باکتری طیف وسیعی از فعالیت ضدمیکروبی علیه پاتوژن‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر از خود نشان داد که بیشترین اثر ممانعتی نیز بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد. Salvatierra و همکاران (۲۰۰۴)، به بررسی اثر ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسسیلوس اسیدوفیلوس* در دو غلظت مختلف علیه باکتری پاتوژن *استافیلوکوکوس اورئوس* در محصول ماست پرداختند و نشان دادند جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* در محصول حاوی باکتری پروبیوتیک بعد ۸ روز به سطح غیر قابل تشخیصی کاهش پیدا کرد در حالی که در نمونه کنترل که فاقد باکتری پروبیوتیک بود تا روز ۲۴ این باکتری قابل تشخیص بود (۳۲). Ogunbanwo و همکاران (۲۰۰۳) اثر ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس برویس* را مورد بررسی قرار دادند و بیشترین اثر ضد میکروبی علیه *باسیلوس سرئوس* و کمترین اثر ضد میکروبی علیه *یرسینیا انتروکولیتیکا* مشاهده شد (۳۳).

مطابق با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، ۵ سویه شامل باکتری‌های *لاکتوباسیلوس ساکی*، *لاکتوباسیلوس پارا‌پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس آگیلیس*، *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* بودند از پنیر محلی شهرستان بهبهان جداسازی و شناسایی شد. ۴ سویه فعالیت لیپولیتیکی نشان دادند که بیشترین فعالیت لیپولیتیکی متعلق به *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* و کمترین مقدار متعلق به *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* بود. براساس نتایج آزمون ضد-میکروبی *اشرشیا کلی* مقاوم‌ترین و *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس‌ترین سویه نسبت به سوپرناتانت اسیدی و خنثی شده باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* بودند. با توجه به نتایج به-دست آمده سویه *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* دارای بهترین ویژگی‌های تکنولوژیکی و ضدمیکروبی جهت استفاده به‌عنوان کشت الحاقی در صنایع لبنی می‌باشد.

سپاس‌گزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Renner E. Nutritional aspects of cheese. Cheese: chemistry, physics and microbiology: Springer; 1993. p. 557-79.
2. Phillips M, Kailasapathy K, Tran L. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. International Journal of Food Microbiology. 2006;108(2):276-80.
3. Rulikowska A, Kilcawley KN, Doolan IA, Alonso-Gomez M, Nongonierma AB, Hannon JA, Wilkinson MG. The impact of reduced sodium chloride content on Cheddar cheese quality. International Dairy Journal. 2013;28(2):45-55.
4. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. The American journal of Clinical Nutrition. 2001;73(2): 365-73.
5. Peres CM, Peres C, Hernández-Mendoza A, Malcata FX. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria–with an emphasis on table olives. Trends in Food Science & Technology. 2012; 26(1): 31-42.
6. Vasiee A, Mortazavi SA, Sankian M, Yazdi FT, Mahmoudi M, Shahidi F. Antagonistic activity of recombinant *Lactococcus lactis* NZ1330 on the adhesion properties of *Escherichia coli* causing urinary tract infection. Microbial Pathogenesis. 2019; 133:103547.
7. Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E, Kotzekidou P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat Science. 2003;65(2):859-67.

8. García-Ruiz A, de Llano DG, Esteban-Fernández A, Requena T, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. Food Microbiology. 2014; 44:220-5.
9. Piraino P, Zotta T, Ricciardi A, McSweeney PL, Parente E. Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study. International Dairy Journal. 2008;18(1):81-92.
10. Izadi-Mehr Z, Yavarmanesh M, Habib MB, Edalatian MR. Technological and antimicrobial characteristics of nonpathogenicstrainsEnterococcus faeciumsubsp. faeciumisolated from traditional cheese. Journal of Food Science and Technology. 2018; 81 (15): 479-92. [In Persian].
11. Kfili T, Ali Nesaee M. Identification and genetic diversity of non-starter lactic acid bacteria in Taleshi mature cheese. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 2017; 7 (26): 111-7. [In Persian].
12. Ehsani A, Mahmoudi R, Hashemi M, Raeisi M. Identification of lactobacillus species isolated from traditional cheeses of west Azerbaijan. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2014;8(1):38-43. [In Persian].
13. Hasani M, Hesari J, Farajnia S, Moghadam M. Technological characterisation of predominant lactobacilli isolated from traditional Lighvan cheese. Journal of Food Research. 2012: 21 (4): 539-51. [In Persian].
14. Abdi R, Sheikh-Zeinoddin M, Soleimanian-Zad S. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian Lighvan cheese. Pakistan Journal of Biological Sciences (PJBS). 2006; 9: 99-103.
15. Ghotbi M, Zad S, Sheikh-Zeinoddin M. Identification of facultative heterofermentative Lactobacillus species in Lighvan cheese. Iranian Food Science & Technology Research Journal. 2010; 6(2): 145-8.
16. Vasiee AR, Mortazavi A, Tabatabaei-yazdi F, Dovom MR. Detection, identification and phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh, Iranian fermented cereal product, by amplifying the 16s rRNA gene with universal primers and differentiation using rep-PCR. International Food Research Journal. 2018;25(1): 423-32.
17. Ayad EH, Omran N, El-Soda M. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from artisanal Egyptian Ras cheese. Le Lait. 2006;86(4):317-31.
18. Piraino P, Zotta T, Ricciardi A, McSweeney PL, Parente E. Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study. International Dairy Journal. 2008;18(1):81-92.
19. Kandil S, El Soda M. Influence of freezing and freeze drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains. Advances in Microbiology. 2015;5(6):371-82.
20. Yamada K, Ota Y, Machida H. Production of lipase by microorganisms (II) Determination of lipase. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan. 1962; 36: 860-4.
21. Mirnejad R, Vahdati AR, Rashidiani J, Erfani M, Piranfar V. The antimicrobial effect of *lactobacillus casei* culture supernatant against multiple drug resistant clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* in vitro. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2013;15(2):122-6.
22. Koohestani M, Moradi M, Tajik H, Badali A. Effects of cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Lactobacillus casei* 431 against planktonic form and biofilm of *Staphylococcus aureus*. In Veterinary Research Forum. 2018; 9(4):301-6.
23. Ben Abda I, De Monbrison F, Bousslimi N, Aoun K, Bouratbine A, Picot S. Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous Leishmania species in Tunisia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2011;105(1):17-22.
24. Torres-Llanez MJ, Vallejo-Cordoba B, Díaz-Cinco ME, Mazorra-Manzano MA, González-Córdova AF. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. Food Control. 2006;17(9):683-90.
25. Nieto-Arribas P, Seseña S, Poveda JM, Palop L, Cabezas L. Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in processing of artisanal Manchego cheese. Journal of Applied Microbiology. 2009;107(5):1505-17.
26. Davati N, Zibaee S. Isolation and identification of lactic acid bacteria from drinking yogurt of Iranian one humped camel milk and evaluation of their technological properties. The Journal of Food Science and Technology, 2017; 65 (14): 311-22. [In Persian].
27. Piraino P, Zotta T, Ricciardi A, McSweeney PL, Parente E. Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta Filata cheeses: A multivariate screening study. International Dairy Journal. 2008;18(1):81-92.
28. Hannon JA, Wilkinson MG, Delahunty CM, Wallace JM, Morrissey PA, Beresford TP. Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. International Dairy Journal. 2003;13(4):313-23.
29. Herrero M, Mayo B, Gonzalez B, Suarez JE. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. Journal of Applied Bacteriology. 1996;81(5):565-70.
30. Ukwuru MU, Ibeneme CI. Biotechnological Properties of Microorganisms Isolated from Traditional Fermented Foods. Focusing on Modern Food Industry. 2014; 3:10-18.
31. Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Falah F. Inhibition of *Escherichia coli* adhesion to human intestinal Caco-2 cells by probiotic candidate *Lactobacillus plantarum* strain L15. Microbial Pathogenesis. 2019; 136: 103677.
32. Salvatierra M, Molina A, Gamboa MM, Arias ML. Evaluation of the effect of probiotic cultures on two different yogurt brands over a known population of *Staphylococcus aureus* and the production of thermonuclease. Archivos Latinoamericanos de Nutricion. 2004; 54(3):298-302.
33. Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. African Journal of Biotechnology. 2003; 2(8):219-27.

Isolation and Identification of *Lactobacillus* Strains from Behbahan Local Cheeses and Investigation of Technological and Antimicrobial Properties of These Strains against Food Pathogens

Alizadeh Behbahani B[1], Noshad M[2]*

1. **Corresponding author: Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran*
Email: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

2- *Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran*

Received 15 Jul, 2020 **Accepted 5 Oct, 2020**

Background and Objectives: Nowadays, use of lactic acid bacteria (LAB) in foods is increasing to induce health effects. The aim of this study was to isolate and identify LAB from local cheeses in Behbahan, Iran, as well as assessing their technological and antimicrobial properties.

Materials & Methods: *Lactobacillus* spp. were identified using biochemical tests. After grouping the bacterial isolates based on their carbohydrate fermentation profiles, bacteria were identified using 16S rRNA gene sequencing technique. The bacterial acid production, autolytic and lipolytic activities were assessed as well. Antimicrobial activity of the strains with the best response to technological tests was investigated against pathogenic bacteria.

Results: The *Lactobacillus* population of local cheeses from Behbahan belonged to five bacterial species of *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus salivarius*. The bacterial ability to lower the pH was assessed at 30 °C for 3, 6 and 24 h. Except *L. paraplantarum* and *L. salivarius*, which decreased pH less than 0.4 U within 3 h, the other strains showed abilities to produce appropriate acid quantities within a short time. The highest acid production belonged to *L. helveticus* strain with decreases of 0.66 U pH within 3 h. All strains showed good autolytic activities. Based on the results, four strains showed lipolytic activities; of which, the highest lipolytic activity belonged to *L. helveticus* and the lowest belonged to *L. salivarius*. Results of antimicrobial assessments showed that acidic and neutralized supernatants of *L. helveticus* included effects on all pathogenic strains. In general, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were the most resistant and the most susceptible strains, respectively.

Conclusion: Based on the results, *L. helveticus* showed the best technological and antimicrobial properties for use as an adjunct culture in dairy industries.

Keywords: Cheese, *Lactobacillus helveticus*, Autolytic activity, Lipolytic activity, Anti-microbial effect