



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، گروه زیست‌شناسی

سلولی و مولکولی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروب شناسی صنعتی (بیوتکنولوژی میکروبی)

روش مطالعه و جداسازی میکروبه‌های ماست و تهیه ماست

دکتر سهیلا عباسی

مقدمه

تخمیر شیر یک روش نسبتاً ساده، ارزان و ایمن برای نگهداری آن می‌باشد. تاریخچه شیرهای تخمیر شده بسیار قدیمی بوده و منشأ اصلی آن‌ها را آسیای مرکزی می‌دانند. به تعدادی از این فراورده‌ها، خواص دارویی-درمانی ویژه‌ای نسبت داده می‌شود. **باکتری‌های لاکتیک**، ضمن تخمیر، با تبدیل **لاکتوز** به **اسیدلاکتیک**، pH شیر را **کاهش** داده و به این ترتیب مانع رشد و ادامه‌ی حیات **پاتوژن‌ها** می‌گردند.

از طرف دیگر، کاهش مقدار لاکتوز امکان استفاده از این فراورده‌ها را برای افراد مبتلا به عدم تحمل لاکتوز فراهم می‌آورد. اصول تولید فراورده‌های تخمیری شیر تقریباً یکسان بوده ولی جزئیات آن بنا بر نوع محصول و نوع مایه میکروبی به کار رفته بسیار متفاوت است.

ماست

- ماست یکی از قدیمی‌ترین فرآورده‌های میکروبی است که در طول قرون گذشته به عنوان یک ماده‌ی غذایی مهم، در بسیاری از کشورهای آسیای تهیه و مصرف می‌شده است.
- در حال حاضر به علت اهمیت غذایی ماست و به علت حضور باکتری‌های مفید در آن نه تنها به عنوان یک ماده غذایی سالم بلکه به عنوان یک فرآورده‌ی پروبیوتیک مصرف آن در تمام دنیا افزایش چشمگیری پیدا نموده است.

• به همین علت مطالعات بسیار گسترده‌ای برای تهیه‌ی انواع ماست در طول ۲۰ سال گذشته انجام شده است و نتایج بسیار مطلوبی به دست آمده و مشخص گردیده تعدادی از لاکتوباسیل‌ها و استرپتوکوکوس‌ها نه تنها در تبدیل شیر به ماست دخالت دارند بلکه حضور این دسته از باکتری‌ها در ماست باعث ترمیم میکروفلور طبیعی روده بزرگ گردیده و از بسیاری از بیماری‌های گوارشی و حتی سرطان روده جلوگیری به عمل می‌آورند.

ماست

- ماست غذای مختصر با کالری پایین، مورد پسند عموم بوده و باعث سلامتی می‌شود. منبع غنی کلسیم و ویتامین D و مواد معدنی مهم، پروتئین‌های قابل هضم و بسیاری مواد مهم دیگر جهت سلامتی می‌باشد.
- تخمیر ماست نتیجه دو تخمیر لاکتیکی همراه با هم است که عوامل تخمیر آن عبارت از لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس می‌باشند. عطر ماست وابسته به فعالیت استرپتوکوک است.
- در ابتدا pH جهت فعالیت استرپتوکوک مناسب است و شروع تخمیر اسیدی را تضمین می‌کند و عمل تجزیه کاربئن محرک رشد استرپتوکوک می‌باشد و سپس شرایط برای ادامه‌ی فعالیت نامناسب شده و لاکتوباسیل‌ها جانشین می‌شوند. زمانی که اسیدیته بالا رفت، انعقاد صورت می‌گیرد.

برای تهیه ماست در درجه اول نیازمند یک شیر با کیفیت خوب هستیم که:

✓ اولاً عاری از هر گونه میکروب پاتوژن باشد.

✓ ثانیاً فاقد بو و طعم بد باشد که ممکن است در اثر فعالیت میکروبی سرمادوست یا مزوفیل که به شدت لیپولیتیک یا پروتئولیتیک هستند ایجاد شده باشد.

✓ ثالثاً شیر یا محتویات پروتئینی خوب اثر مثبت روی قوام آن دارد و ارزش غذایی ماست را بالا می‌برد.

✓ رابعاً شیر باید بدون آنتی بیوتیک باشد.

- متداول است که شیر را به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در دمای ۹۰-۸۰ درجه سانتیگراد نگه می‌دارند. علت این کار این است که باعث می‌شود:
- اولاً میکروبهای پاتوژن و نامطلوب از بین برود.
- دوم این که حرارت باعث تغییرات مناسبی روی ترکیبات شیر می‌شود که کاهش طعم تلخی را سبب می‌شود. به مقدار کمی باعث افزایش اسیدهای آمینه آزاد شده و در نتیجه رشد میکروب‌های تلقیحی را ترغیب می‌کند. همچنین باعث کاهش فعالیت بازدارنده‌های رشد می‌شود.
- سوم این که قوام ماست را افزایش می‌دهد و سبب کاهش جدایی و یا تفکیک قسمت آبکی می‌شود.

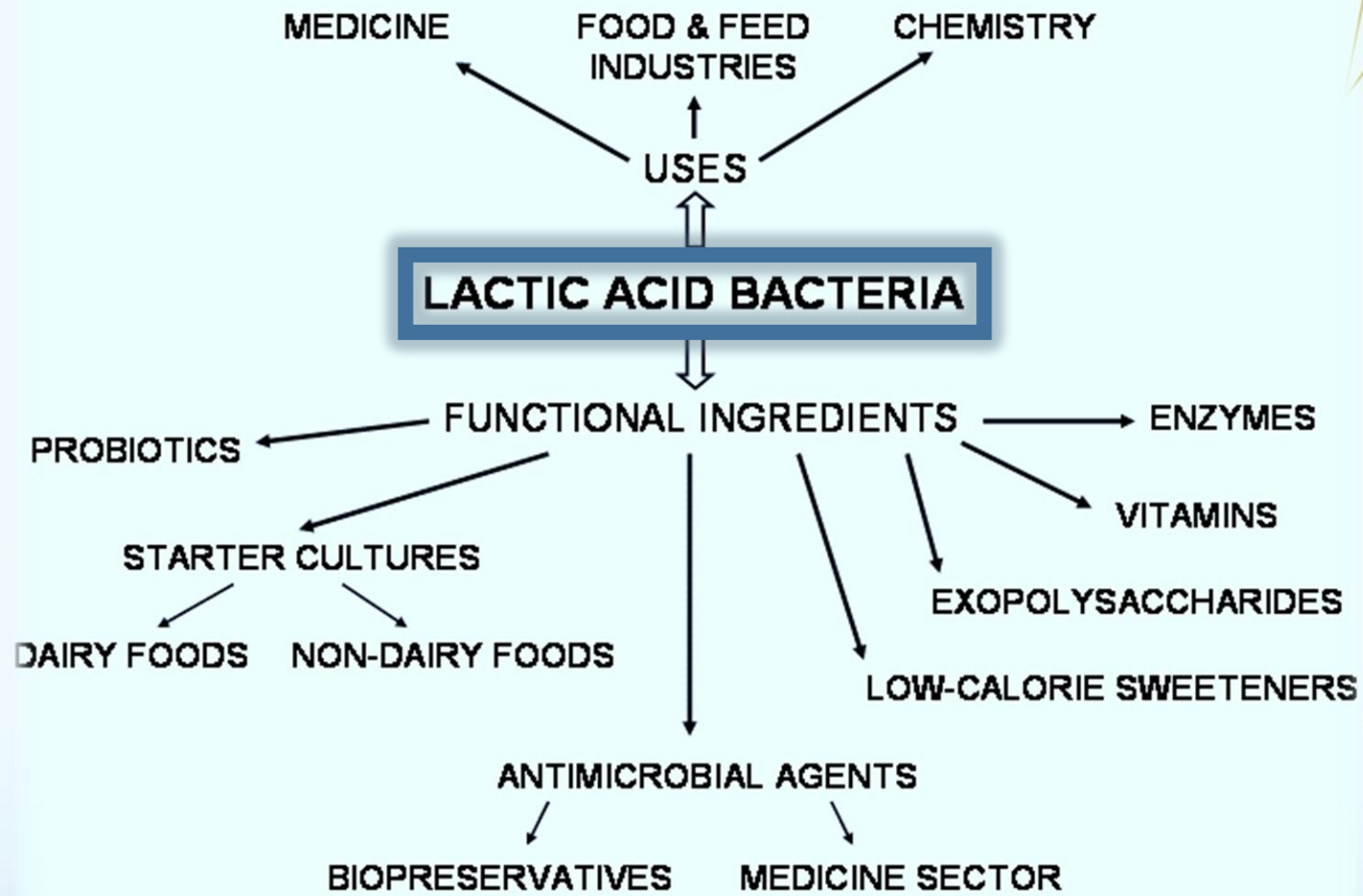
ماست

- حرارتی که برای عمل **فرمانتاسیون** به کار می‌رود حائز اهمیت است و همچنین مدت زمان تخمیر از اهمیت خاصی برخوردار است. پس از هر گونه **تغییر درجه حرارت** در مدت تخمیر باید **جلوگیری** کرد. از طرفی پس از انجام عمل فرمانتاسیون محصول را **سرد** می‌کنند.
- علت این عمل کاهش فعالیت متابولیکی **باکتری‌های لاکتیک** است. زمان انجام این عمل حائز اهمیت است زیرا اگر محصول زود برداشت شود نمونه ما **قوامش** را ندارد و قسمت آبکی جدا از بقیه قسمت هاست و دارای طعم و بوی **ضعیفی** است و اگر این عمل دیر انجام شود به علت افزایش اسیدیته محیط بیشتر به تلخی گرایش دارد.
- زمان برداشت محصول پیشنهاد می‌شود هنگامی باشد که **pH حدود ۴/۴ - ۷/۲** باشد. از جمله مواردی که باید در هنگام تولید ماست در نظر بگیریم اجتناب از هر گونه **آلودگی** است که در فعالیت باکتری‌های لاکتیک **اختلال** ایجاد کند.

لاکتوباسیل‌ها

این باکتری‌ها میله‌ای شکل، گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری یا میکروآئروفیلیک هستند. اندازه‌ی آن‌ها می‌تواند کوتاه یا بلند، کلفت یا باریک و ... باشد و متغیر است. بیشتر گونه‌های آن هموفرمانتاتیو هستند. اما بعضی نیز هتروفرمانتاتیو می‌باشند.

لاکتوباسیل‌ها در محصولات لبنی بسیار یافت می‌شوند و بعضی سویه‌ها در تهیه محصولات تخمیری شیر استفاده می‌شوند. به عنوان مثال لاکتوباسیلوس دلبروکی در تهیه ماست، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تهیه شیر تخمیری اسیدوفیلوس و دیگر گونه‌ها در تهیه دوغ، کره و غیره به کار می‌روند.

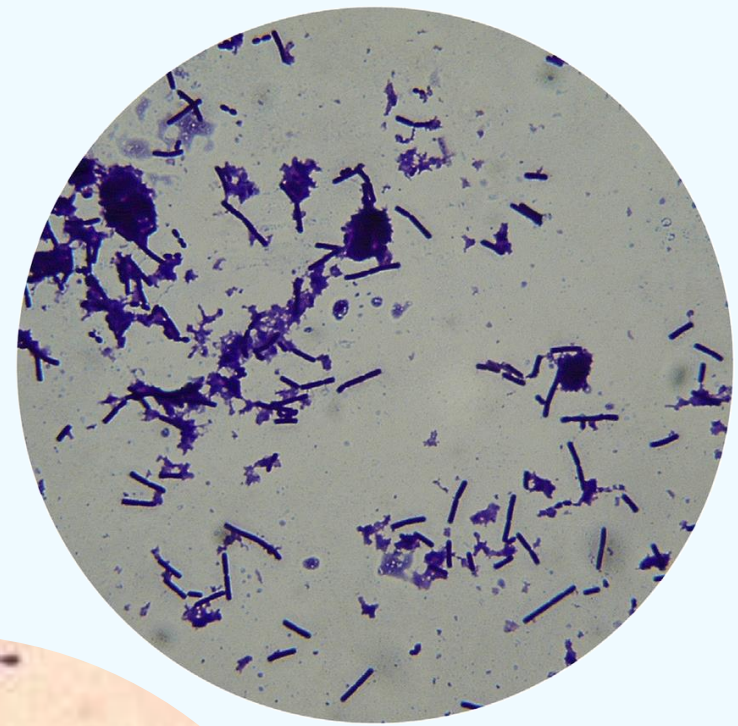
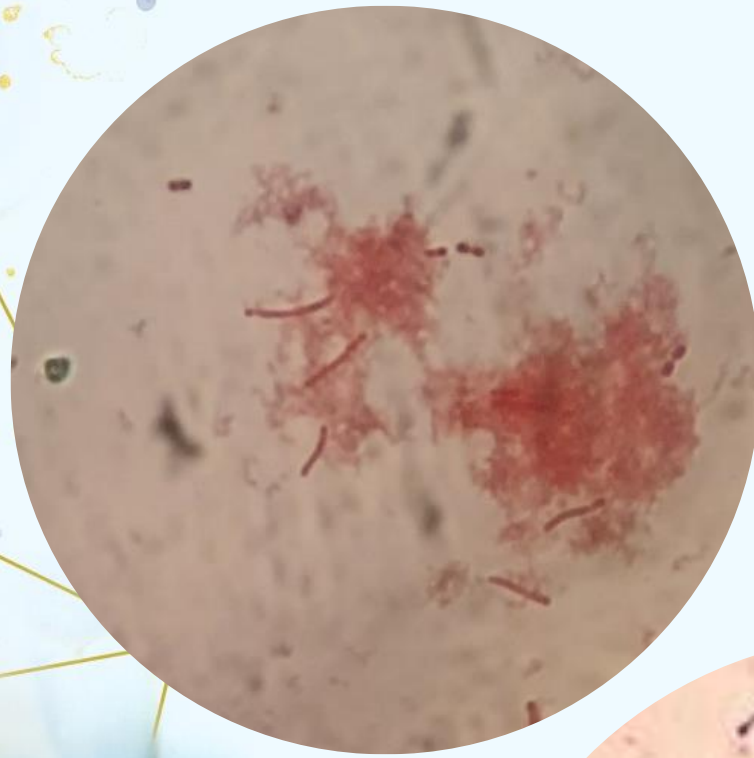
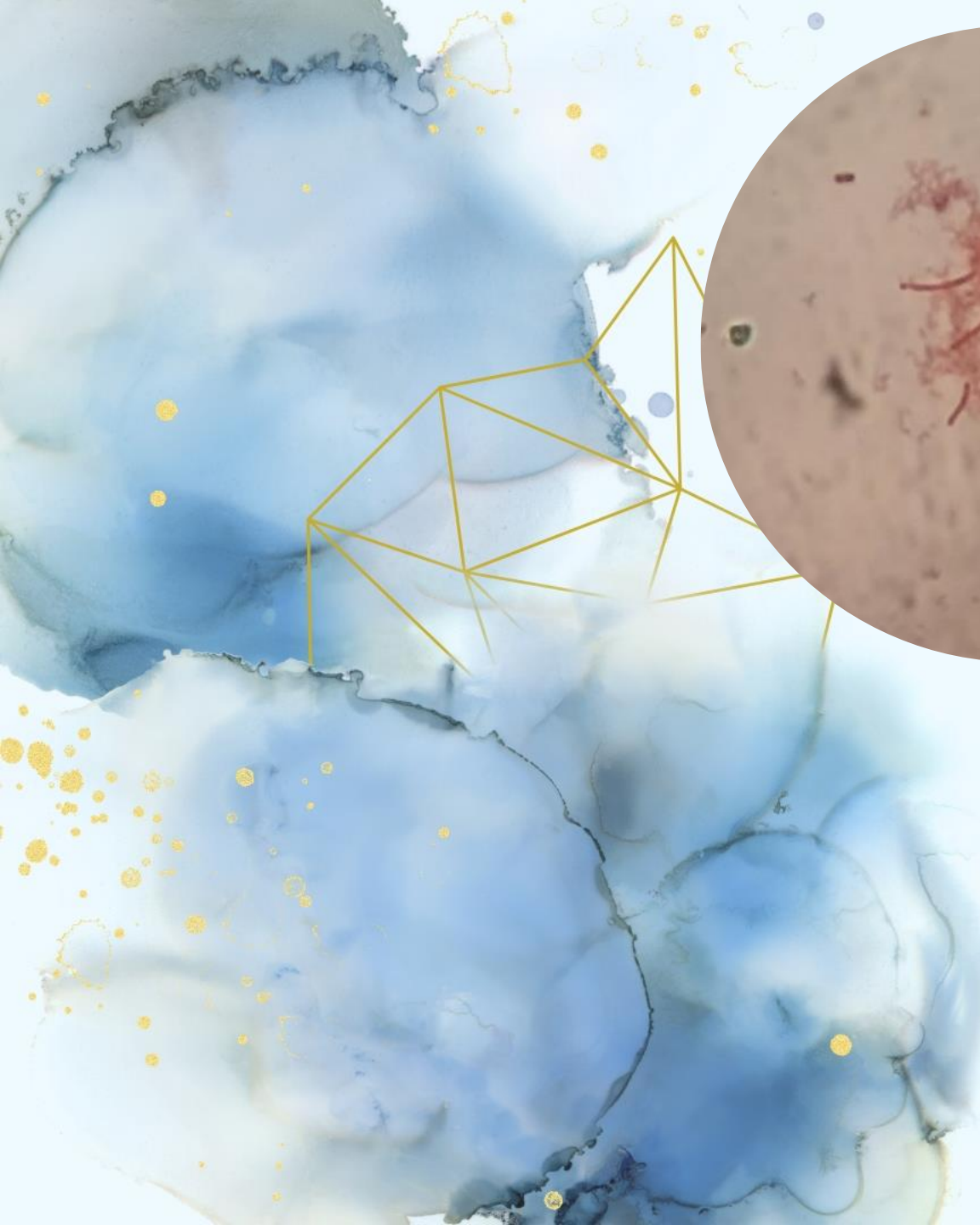


مواد و وسایل مورد نیاز برای آزمایش:

- ✓ نمونه ماست تازه
- ✓ محلول رینگر یا آب مقطر استریل در ارلن
- ✓ آب مقطر استریل در لوله
- ✓ میله شیشه‌ای سرکج
- ✓ پی‌پت استریل
- ✓ لام
- ✓ محلول‌های رنگ‌آمیزی ساده و گرم
- ✓ گزیل - محیط کشت PCA (پلیت کانت آگار)
- ✓ محیط کشت MRS
- ✓ محیط کشت یوگن آگار
- ✓ محیط کشت آگار لی
- ✓ محیط کشت M16
- ✓ نمونه شیر تازه

روش کار برای مطالعه میکروسکوپی میکروب‌های ماست:

- ۱- یک قطره **ماست** را روی لام تمیز قرار دهید و اسمیر آن را تهیه کنید.
- ۲- اسمیر را خشک و سپس فیکس کنید.
- ۳- به اسمیر فیکس شده چند قطره **گزیل** اضافه کنید تا **چربی‌های** ماست برطرف شود.
- ۴- سپس لام را خشک کنید. (بدون شستشو) و با استفاده از تکنیک **رنگ آمیزی گرم** آن را رنگ کنید
- ۵- پس از رنگ‌آمیزی لام را زیر میکروسکوپ قرار دهید و با عدسی ۱۰۰ باکتری‌ها و سایر میکروارگانیسم‌های ماست را مشاهده و ویژگی‌های هر یک را یادداشت کنید.



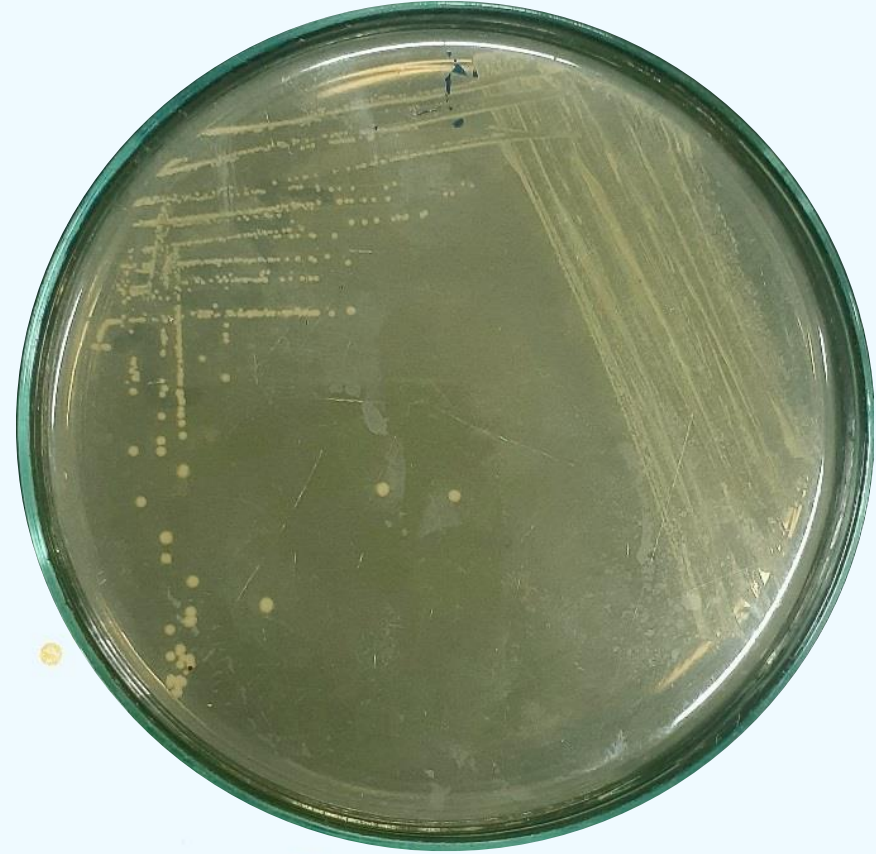
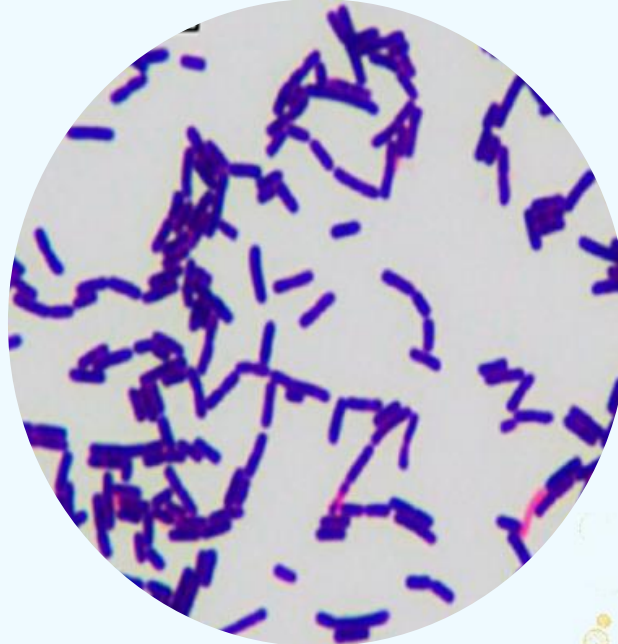
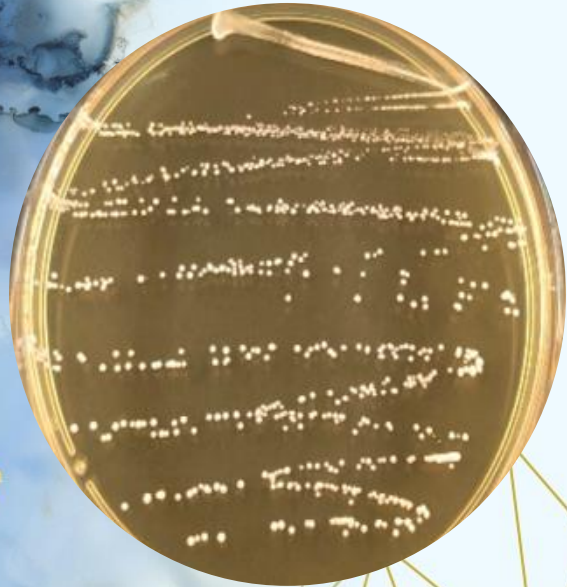
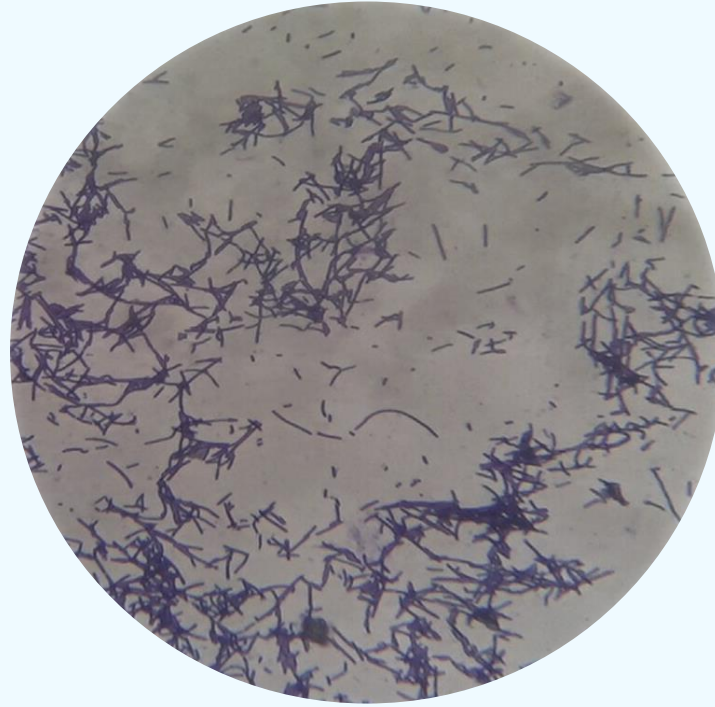
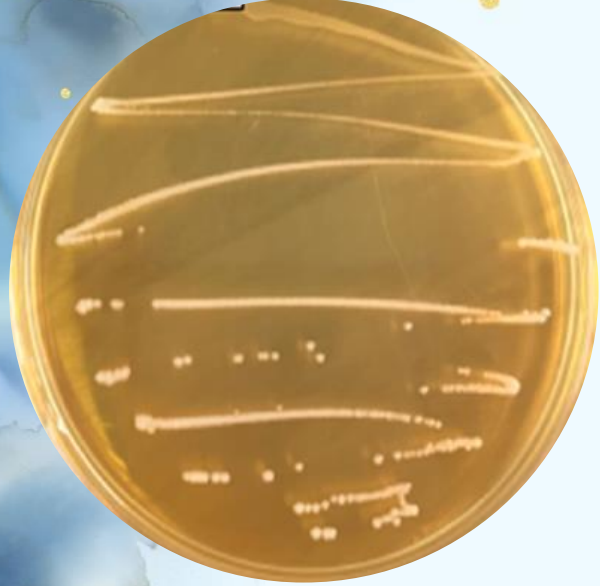
دکتر سهیلا عباسی

روش کار برای شمارش باکتری‌های ماست:

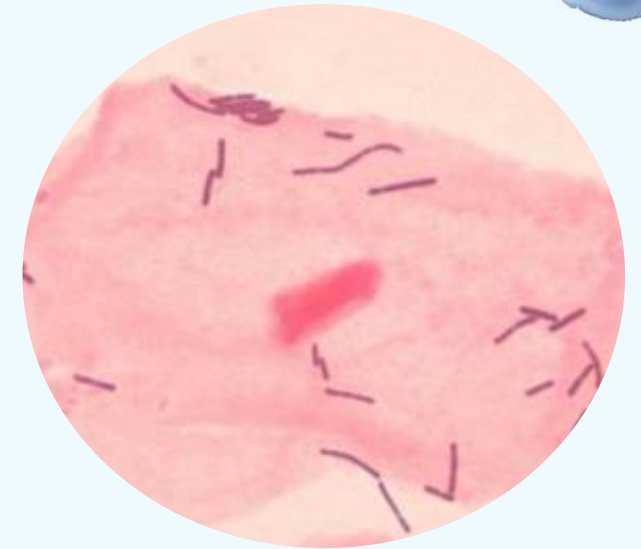
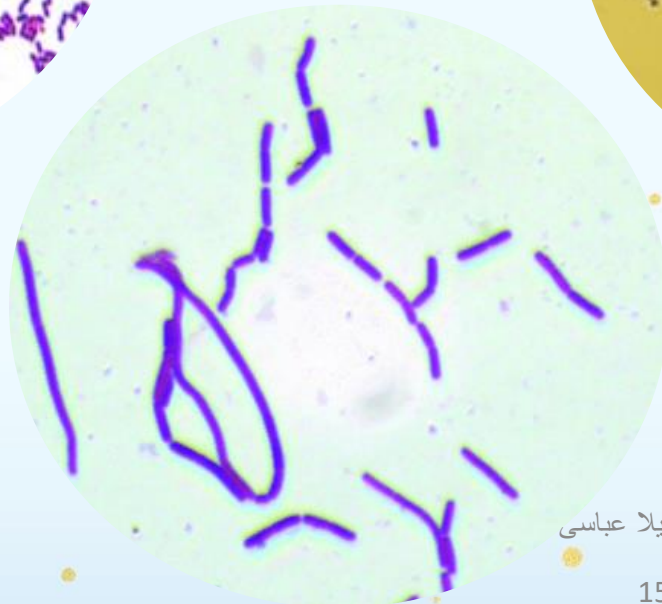
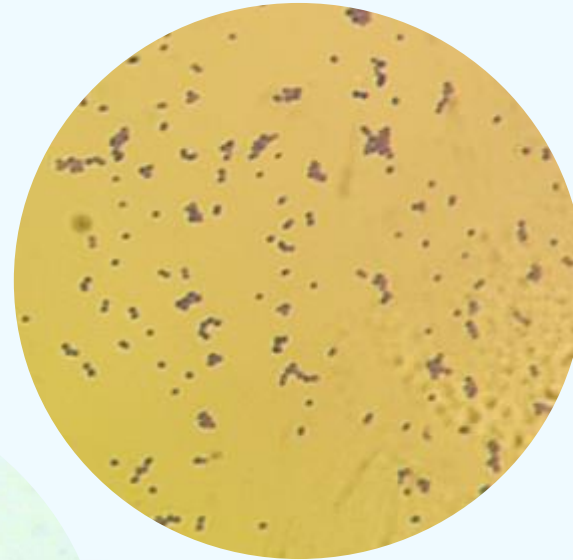
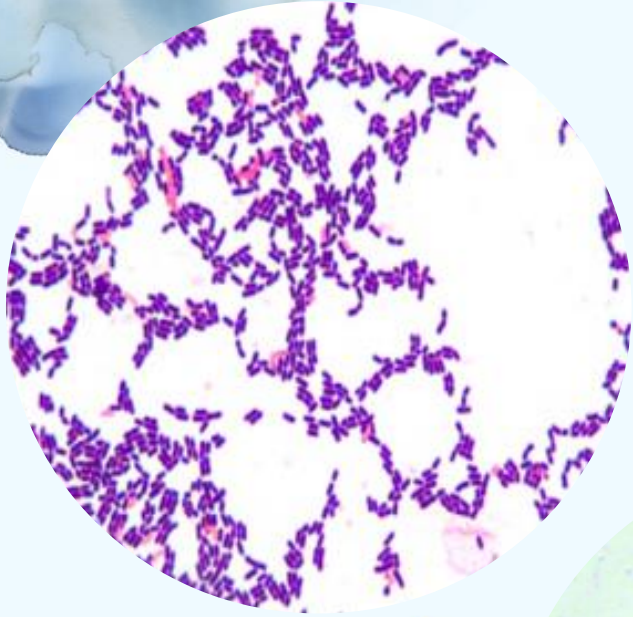
- ۱- ده گرم ماست تازه به ۹۰ سی سی محلول رینگر اضافه کنید و آن را تکان دهید تا مخلوط شود.
- ۲- یک سی سی از ماست رقیق شده را به لوله حاوی ۹ سی سی آب مقطر استریل اضافه کنید و لوله را تکان دهید تا مخلوط شود.
- ۳- مجدداً یک سی سی از لوله قبلی به یک لوله‌ی حاوی ۹ سی سی آب مقطر استریل اضافه کنید و تکان دهید.
- ۴- سپس ۱ سی سی و یا ۱/۰ سی سی از رقت نهایی را به محیط کشت PCA اضافه کنید و با میله شیشه‌ای سرکج آن را به صورت چمنی پخش کنید.
- ۵- پلیت را به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید.
- ۶- پس از انکوباسیون کلنی‌ها را شمارش نمایید و تعداد باکتری‌ها را در ۱۰ گرم ماست را مشخص نمایید.

روش کار برای جداسازی لاکتوباسیل‌ها از ماست:

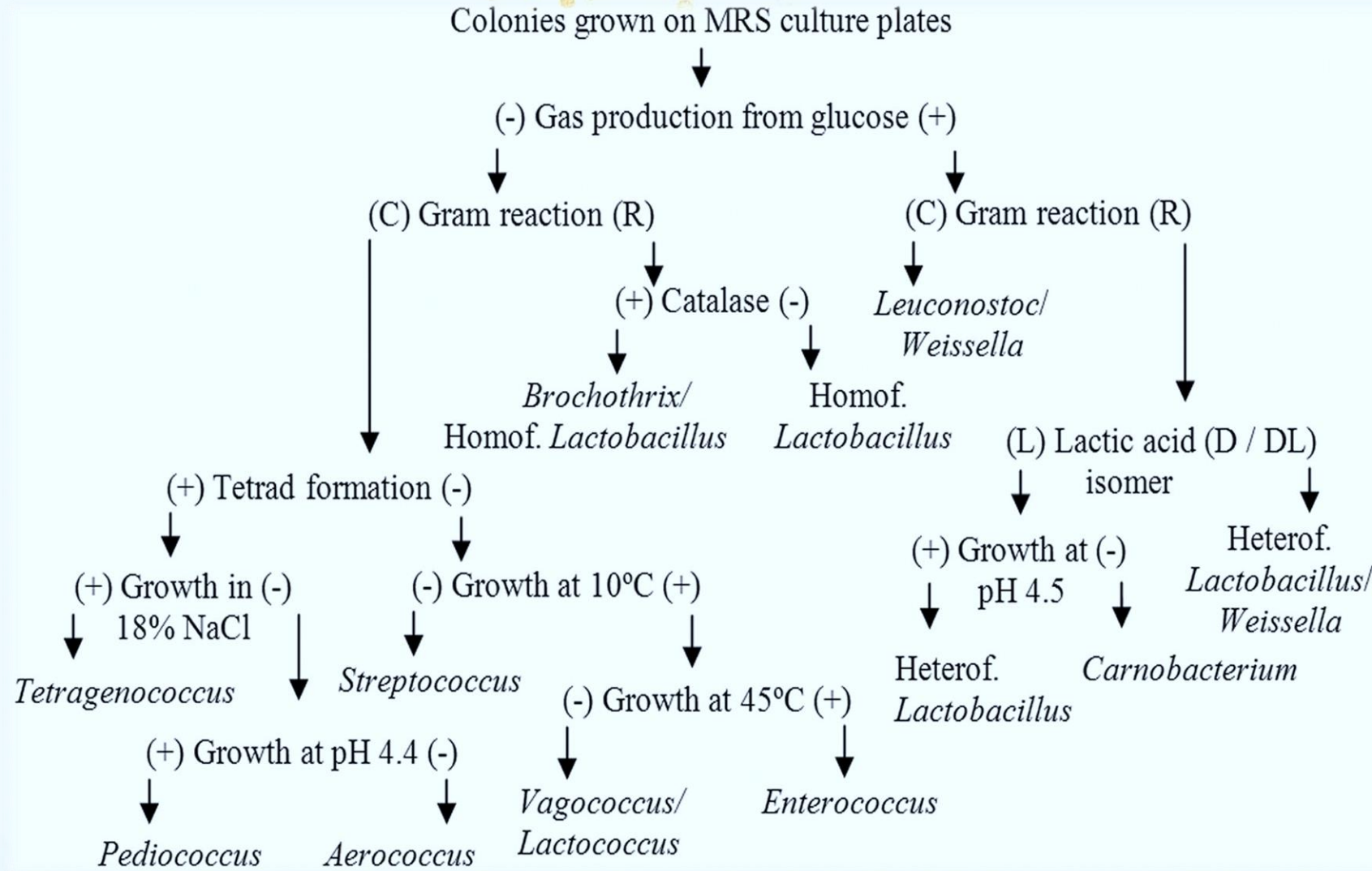
- ۱- با استفاده از سوآب سرپنبه‌ای استریل مقداری از ماست تازه را روی محیط کشت MRS و سایر محیط کشت های لاکتوباسیلوس‌ها تلقیح کنید.
- ۲- پلیت‌های تلقیح شده را به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید. (تعدادی از پلیت‌ها را در جار بی‌هوایی قرار داده و در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید و تعدادی از پلیت‌ها را در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد قرار دهید.
- ۳- بعد از اتوو گذاری پلیت را در کنار شعله باز کنید و کلنی‌های ایجاد شده را بررسی کنید.
کلنی لاکتوباسیلوس‌ها کوچک، محدب و براق است.
- ۴- از کلنی‌های لاکتوباسیلوس با رعایت اصول آسپتیک کشت خالص تهیه کنید.



Streptococcus

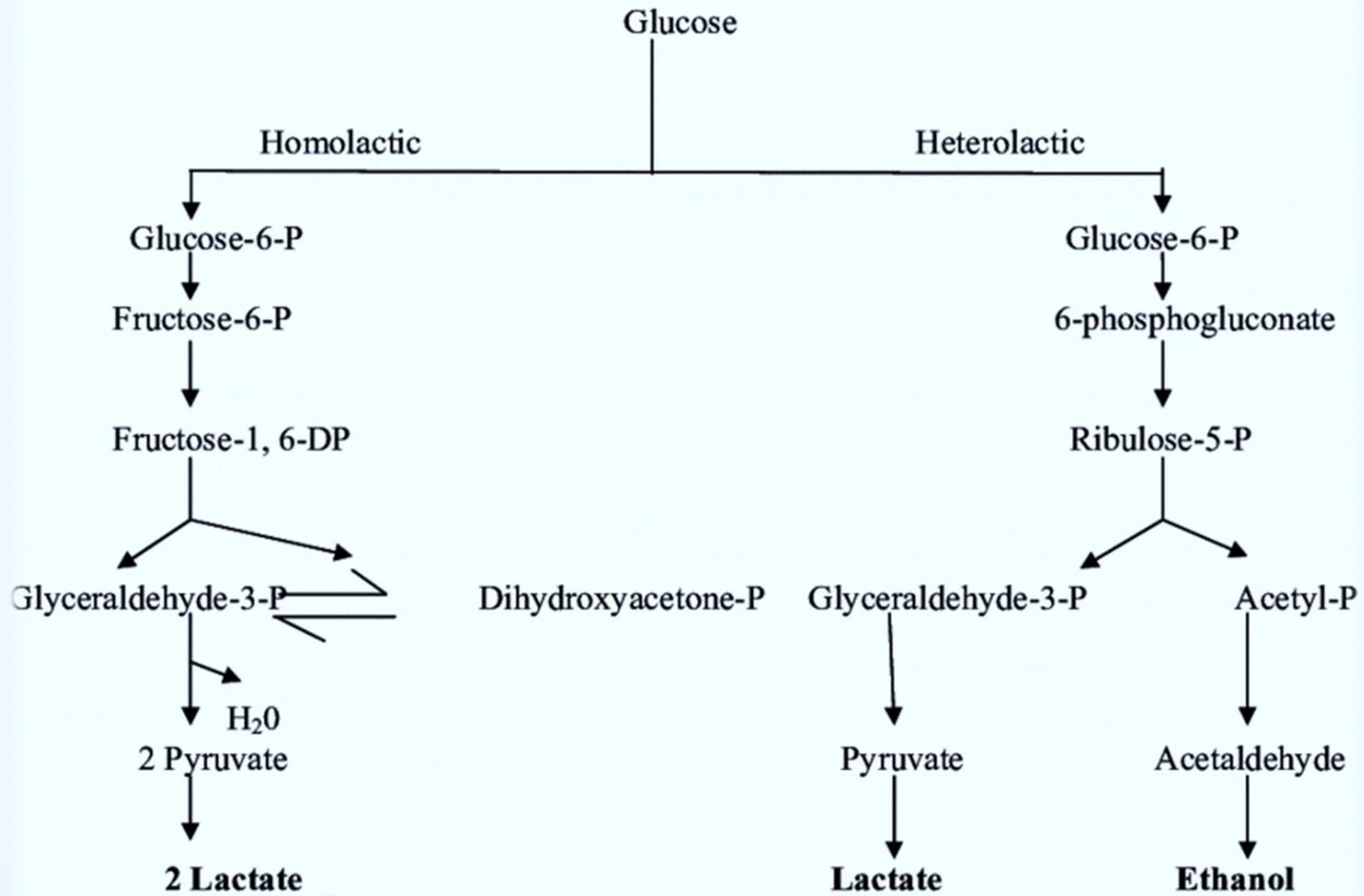


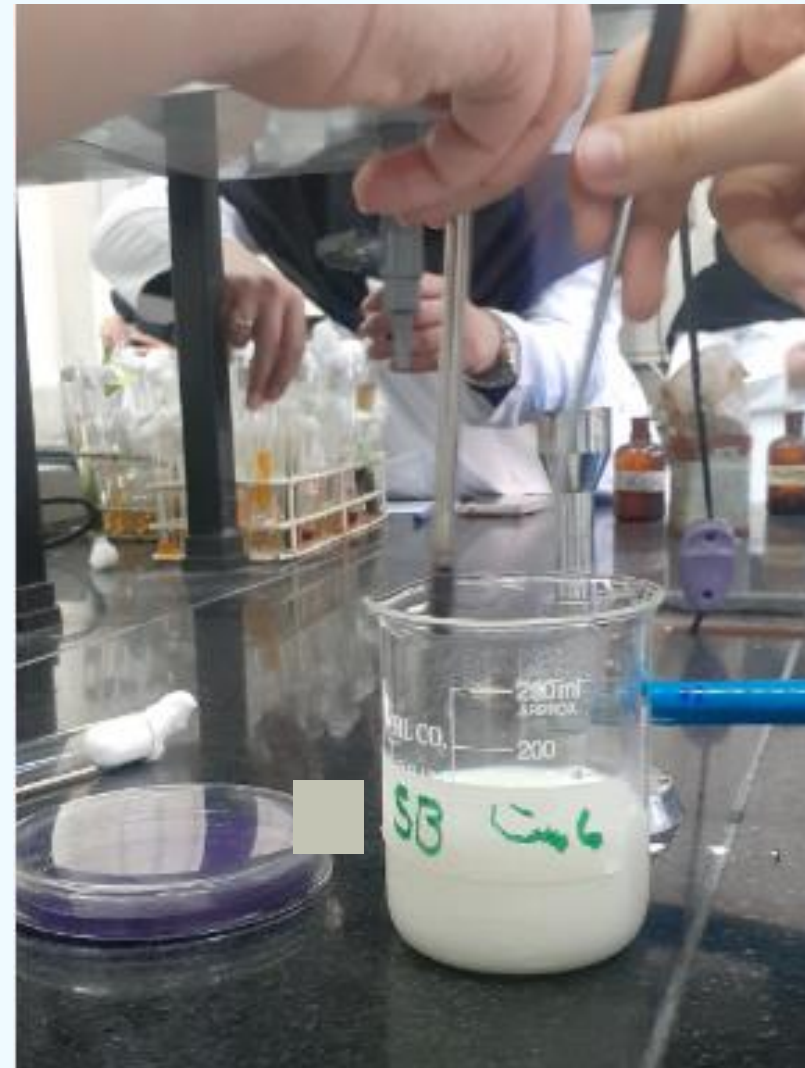
Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus



تهیه ماست با استفاده از کشت خالص لاکتوباسیلوس‌ها و استرپتوکوکوس‌ها

- ۱- نمونه شیر تازه را بجوشانید. (به مدت ۲۰ دقیقه)
- ۲- بعد از خنک شدن شیر مقدار ۱۰۰ سی سی از آن را درون یک بشر کوچک تمیز بریزید.
- ۳- سپس با لوپ استریل مقداری از کلنی لاکتوباسیلوس‌ها و سپس مقداری از کلنی استرپتوکوکوس‌ها را به شیر اضافه کنید.
- ۴- درب بشر را با کاغذ آلومینیومی بپوشانید و آن را به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید.
- ۵- قبل از بررسی ماست، آن را به مدت یک ساعت در یخچال بگذارید تا کاملاً سرد شود.
- ۶- ماست تهیه شده را از نظر ویژگی‌های یک ماست خوب بررسی نمایید.





تلقیح هر دو نوع باکتری
در شیر جوشیده شده

با تشکر از توجه شما
با آرزوی سلامتی و موفقیت