نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، ص. ۱۲۵-۱۱۷

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 9, No. 2, Summer 2013, p. 117-125

شناسایی وارزیابی تغییرات فلورلاکتیکی ذاتی پنیر کوزه تازه ورسیده بر پایه روش مبتنی بر کشت و تخمیر کربوهیدرات

محمدرضا عدالتیان[1*]- محمدباقر حبیبی نجفی[2]- سید علی مرتضوی[3] - سید مجید هاشمی[4] – مسعود یاورمنش[5]

تاریخ دریافت:۱۳۹۰/۶/۲۷
تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۴/۱۹

چکیده

در این پژوهش، نمونه‌های تازه(یک روزه) و رسیده (۹۰ روزه) پنیر کوزه ، یکی از پنیرهای حاصل از شیرخام، جهت شناسایی فلورلاکتیکی، مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. در مرحله نخست به منظور جداسازی جنس‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک از محیط‌های کشت اختصاصی و انتخابی که شامل MRS برای جنس لاکتوباسیلوس و پدیوکوکوس، M17 برای لاکتوکوکوس، MRS+vancomycin برای لویکونوستوک و KAA برای انتروکوکوس بودند، استفاده گردید. در مجموع تعداد ۴۸ کلنی خالص سازی شده، انتخاب و با انجام تست‌های تاییدی و آزمون‌های بیوشیمیایی و فنوتیپیک تا حد جنس شناسایی شدند. جنس‌های لاکتوباسیلوس (۳۳/۳۳ درصد)، لاکتوکوکوس(۱۲/۵ درصد)، پدیوکوکوس (۲/۰۸ درصد)، انتروکوکوس (۴۷/۹۱ درصد) و آئروکوکوس (۴/۱۶ درصد) به عنوان فراوان ترین جنس ها در نمونه‌های پنیر تازه و رسیده (۹۰ روزه) تایید گردیدند. در مرحله بعد برای شناسایی جدایه‌های مذکور تا مرحله گونه، از تخمیر کربوهیدرات ها با استفاده از کیت‌های API 50 CH وAPI 20 STREP استفاده گردید. در نهایت جنس و گونه‌های *Lactobacillus plantarum*، *Lb. lindneri*، *Lb.brevis*، *Lb. helveticus*، *Lb. pentosus*، *Ent. faecalis*، *Ent. avium*، *Ent. durans*؛ *Aerococcus viridans*؛ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*، *Lb. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*؛ *Lb.fermentum*، *Enterococcus faecium* شناسایی شدند. تغییرات فلورلاکتیکی در دوره رسیدگی و نگهداری به گونه‌ای بود که در مرحله پنیر تازه، جنس‌های لاکتوکوکوس و لاکتوباسیلوس غالب بوده، در حالی که در مرحله پنیر رسیده جنس انتروکوکوس جایگزین شده وفلور غالب را تشکیل می‌دادند.گونه‌های غالب به ترتیب فراوانی در پنیرتازه عبارت بودند از: *Lac. lactis* ssp. *lactis* (۴۴/۴۴ درصد) و *Lb. plantarum* (۲۲/۲۲ درصد) و در مرحله پنیر رسیده گونه‌های *Ent. Faecium* (۴۳/۵۸ درصد)، *Lb.brevis* (۱۲/۸۲ درصد) و *Ent .faecalis* (۷/۶۹ درصد) به عنوان فراوان ترین گونه ها شناسایی شدند. شاید به توان چنین گفت که گونه‌های غالب شناسایی شده در دو مرحله پنیر تازه و رسیده نقش بسزایی در دوره رسیدن و تولید ترکیبات مولد عطر و آروما در اینگونه پنیرهای حاصل از شیر خام دارا هستند. لذا ضرورت شناسایی دقیق تر این گونه ها تا مراحل زیرگونه وسویه و نژاد با کمک روش‌های مولکولی مبتنی بر کشت و نیز مستقل از کشت ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: پنیر کوزه، پنیرهای حاصل از شیرخام، دوره رسیدگی، فلورلاکتیکی

مقدمه

باکتری‌های اسیدلاکتیک، یک گروه هتروژن (نامتجانس)[6] از ارگانسیم‌های گرم مثبت، غیراسپورزا را تشکیل می‌دهندکه در اثر تخمیرقند، تولید اسیدلاکتیک می‌نمایند. توانایی این باکتریها در کاهش pH بوسیله تولید اسید از قند، منجر به توسعه و پیشرفت ویژگی‌های ارگانولپتیک مطلوب شده و از رشدپاتوژن ها جلوگیری کرده ودرنتیجه باعث ثبات و ایمنی محصول نهایی می‌گردند. بنابراین، تولید اسیدلاکتیک به عنوان یک عامل انتخابی عمل کرده که اجازه می‌دهد باکتری‌های لاکتیک غالب شوند. علاوه بر آن، باکتری‌های اسیدلاکتیک غیرآغازگر، در دوره رسیدگی پنیرها به مقادیرمتنابهی یافت می‌شوند و ممکن است از طریق فعالیت‌های بیوشیمیایی، نقش مهمی در رسیدن ایفا نمایند (Durlu-Ozkaya *et al*., 2001). بدست آوردن اطلاعات درمورد ترکیب میکروفلورلاکتیکی طبیعی پنیرهای سنتی، می‌تواند در تعیین آغازگری سهیم باشد که به استاندارد شدن کیفیت و ایمنی محصول درمقیاس صنعتی بدون تغییردر خواص بنیادی آن، کمک می‌نماید.

۱، ۲، ۳، ۴ و۵- به ترتیب استادیار، استادان، دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول: Email: edalatian@um.ac.ir)

6- Heterogeneous

پنیرهای حاصل از شیرخام، معمولا در نواحی روستایی و در مواردی بصورت خانگی از شیرخام گوسفند و بز (یا مخلوط هردو)، با استفاده از رنین طبیعی (یا رنت تجاری) و معمولا بدون افزودن کشت آغازگر تولید می‌شوند. بنابراین فرایندهای تخمیر و رسیدگی این فراورده، کاملا توسط فلورمیکروبی ذاتی موجود در شیر و نیز ناشی از محیط شیردوشی و تولید پنیر، انجام می‌شود (Comunian *et al.*, 2010).

باکتری‌های اسیدلاکتیک برای تولید فرآورده‌های لبنی تخمیری، در تخمیرهای فراورده‌های گوشتی و سیلاژعلوفه از دیرباز، استفاده شده اند. هزاران نژاد و سویه از موادغذایی مختلف جداسازی شده اند و صدها نژاد انتخاب شده نیز به عنوان کشت‌های آغازگر درتخمیرهای غذایی صنعتی به کاررفته اند. اکثرگونه‌های باکتریهای اسیدلاکتیک نقش مهمی را در رسیدن پنیرها، ایفا می‌نمایند (Gurses and Erdogan, 2006).

در بین پنیرهای سنتی حاصل از شیرخام ایرانی، پنیرکوزه، بی شک یکی ازمهم ترین و معروف ترین پنیرهای سنتی تولید شده در استان آذربایجان غربی و غرب کشور می‌باشد که منحصراً از شیر خام گوسفند، بز یا مخلوط هردو، بدون افزودن هر نوع آغازگر ، تولید می‌شود. پنیر کوزه پنیر سخت وتاحدی اسیدی وشورمزه است که حالت گرانولی داشته و ظاهری خشک دارد. تولیدآن بصورت کاملا سنتی می‌باشد و مصرف آن در مناطق غرب کشور رایج است. این محصول به دلیل حفظ مواد مغذی موجود در دلمه، نسبت به پنیر آب نمکی از ارزش غذایی بالایی برخوردار است (موسوی پور و همکاران ،۱۳۸۸) .

اکوسیستم میکروبی ذاتی در پنیرهای سنتی حاصل از شیرخام، به عنوان مهم ترین فاکتور مرتبط با منحصر به فرد بودن (این قبیل فرآورده ها)[1] در نظر گرفته می‌شود. به این دلیل، مطالعه جوامع میکروبی، می‌تواند در انتخاب نژادهای جدید به منظور استفاده برای تولید پنیرهای سنتی درمقیاس زیادو یا برای بهبود تولید فرآورده لبنی موجود، به کارگرفته شود (Colombo *et al.*,2009).

مطالعات میکروبی اندکی بر روی پنیرهای سنتی ایرانی تاکنون صورت گرفته است. نخستین کارهادرمورد شناسایی گونه‌های غالب باکتریهای اسیدلاکتیک در پنیر رسیده لیقوان توسط عبدی و همکاران (۲۰۰۶) و بارویی وهمکاران (۲۰۰۸) صورت گرفت. همچنین کفیلی و همکاران (۲۰۰۹)، لاکتوباسیلوس‌های قابل کشت در دوره رسیدن پنیرلیقوان را مورد بررسی قراردادند. با توجه به اطلاعات موجود وبررسی‌های به عمل آمده، تا کنون هیچ مطالعه جامع و دقیقی در مورد شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک پنیر کوزه در کشور صورت نگرفته است.

هدف ازانجام این پژوهش، جداسازی وشناسایی فلورلاکتیکی پنیرکوزه در دو مرحله پنیرتازه وپنیر رسیده، با استفاده از محیط کشت‌های مختلف بود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه برداری در فصل تابستان و از دو مرحله پنیرتازه (یک روزه) و پنیر رسیده (سه ماه رسیدگی) از ده مرکز تولید کننده پنیرکوزه از ارومیه صورت گرفت. سپس نمونه ها تحت شرایط سردخانه (دمای ۴ درجه سانتیگراد) به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل گردید.

تولید پنیر کوزه

پنیر کوزه در آذربایجان غربی از شیر گوسفند، بز، گاو و گاومیش تهیه می‌شود. ولی شیر گوسفند و بز بیشتر مورداستفاده قرار می‌گیرد. فرآیند تولید این پنیر در شکل ۱ ، قابل مشاهده است.

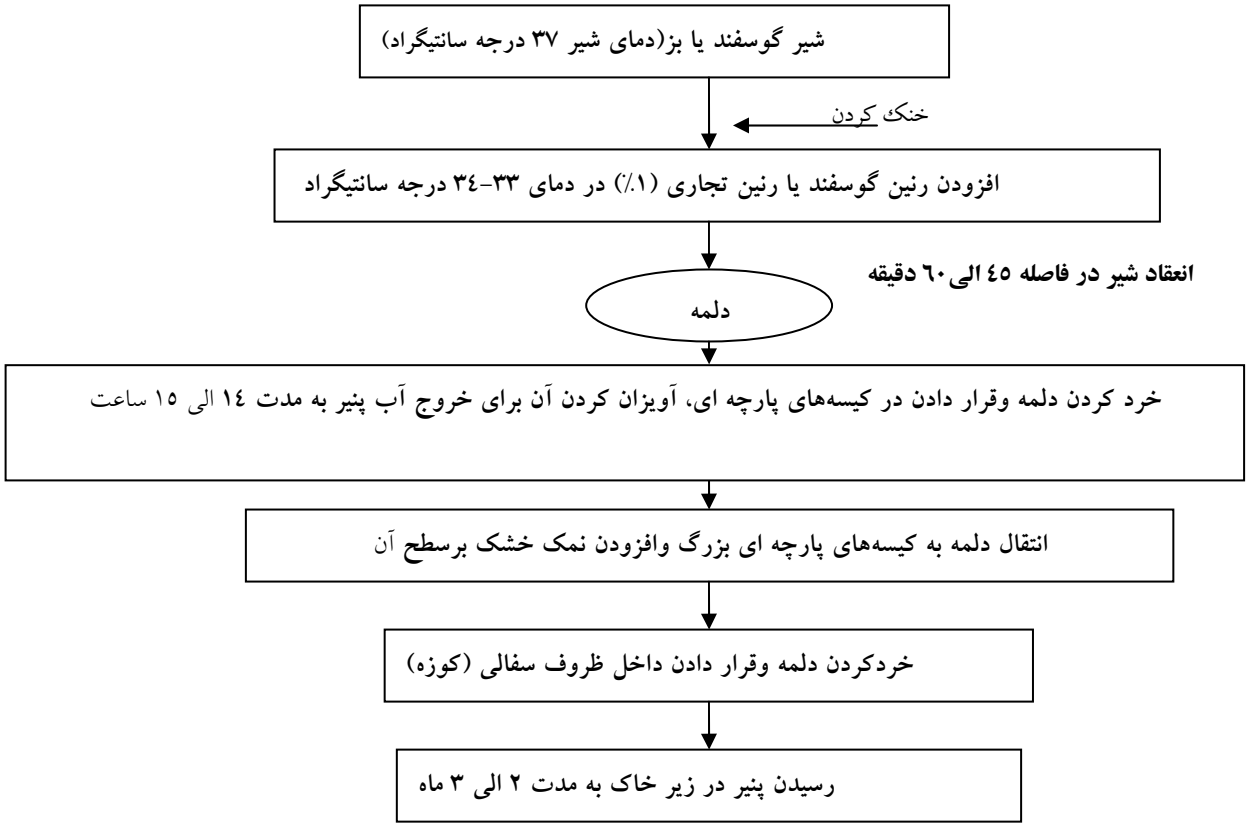
آماده سازی نمونه‌های پنیربرای جداسازی فلورلاکتیکی از آن

ابتدا ۲۵گرم از پنیر تازه و رسیده به ۲۲۵ سی سی محلول سیترات سدیم ۲٪ وزنی- حجمی استریل اضافه شد، مخلوط حاصل به داخل کیسه استریل مخصوص دستگاه استومکر (مدل Seward,UK) منتقل گردید و داخل دستگاه به مدت ۵ دقیقه مخلوط شد، سپس محلول حاصل به عنوان رقت ۰/۱ برای تهیه رقت‌های بعدی استفاده شد. برای رقت‌های بعدی 10^{-2}تا 10^{-7} از آب پپتونه استریل ۰/۱درصد وزنی- حجمی استفاده گردید.سپس از لوله‌های حاوی رقت‌های تهیه شده به میزان ۰/۱ میلی لیتر بوسیله سمپلر (کشت سطحی) روی سطح محیط‌های کشت MRS-Agar برای جداسازی لاکتوباسیل ها، MRS Agar+vancomycin(20µg/mL) برای جداسازی لویکونوستوک ها، M17-Agar برای لاکتوکوکوس ها و KAA[2] برای انتروکوکوس ها (Navidghasemizad *et al.*, 2009) منتقل شد (هر کشت در دوتکرار انجام پذیرفت). لازم به ذکر است که برای هر محیط کشت از رقت‌های مورد نظر یک کشت آمیخته[3] نیز صورت گرفت. سپس محیط‌های کشت تلقیح شده داخل جاربی هوازی مرک به همراه گاز پک مدل A در سه دمای ۳۰، ۳۷ و۴۵ درجه سانتیگراد جهت رشد باکتریهای مزوفیل وترموفیل قرارگرفت. لازم به توضیح است که برای باکتریهای انتروکوکوس در محیط کشتKAA فقط از شرایط هوازی استفاده گردید .مدت زمان گرمخانه گذاری بسته به نوع باکتری بین ۲۴ تا ۴۸ ساعت وحداکثر ۷۲ ساعت در نظرگرفته شد.

1- Typicity

2- Kanamycin Aesculin Azid Agar

3- Pour Plate



شکل۱- نمودار فرایند تولید پنیرکوزه.

پس از سپری شدن مدت گرمخانه گذاری و خروج پلیت ها از داخل جار بی هوازی، ابتدا پلیت‌های حاوی ۲۵ تا ۳۰۰ کلنی شمارش شده وسپس از پلیت‌های دارای بالاترین رقت، ۴ تا ۵ کلنی که از نظر شکل، رنگ و اندازه متفاوت بودند، برداشته شد. جهت خالص سازی بیشتر ۲ تا ۳ بار بر روی همان محیط‌های کشت قبلی، کشت خطی مجدد داده شد.

سپس کلنی‌های خالص بدست آمده درهر پلیت مورد آزمونهای رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، مورفولوژی در زیر میکروسکوپ قرار گرفتند.درنهایت ، فقط جدایه‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی داخل محیط MRS مایع حاوی ۲۰ درصد گلیسرول نگهداری و به صورت انجمادی خشک شدند. در مجموع حدود ۴۸ جدایه ازهمه نمونه‌ها (پنیر تازه و پنیر رسیده) جدا گردیدو مورد آزمون‌های بیوشیمیایی و تست‌های تائیدی قرار گرفتند.

آزمونهای بیوشیمیایی و تست‌های تاییدی

تست رشد در دمای ۱۰ و۴۵ درجه سانتیگراد، رشد در غلظت نمک ۶/۵٪، رشد درpH= ۹/۶، تست هیدرولیز آرژنین به کمک معرف نسلر، هیدرولیز اسکولین، تولید گاز دی اکسید کربن از قند گلوکزدر MRS مایع در لوله دورهام جهت تشخیص هومو یا هتروفرمانتاتیو بودن، تجزیه سیترات در محیط سیمون سیترات آگار وآزمون وگوس-پروسکوئر در محیط MR-VP به عنوان تست‌های تائیدی صورت گرفتند (Edalatian *et al*., 2012).

جدایه‌های کوکسی گرم مثبت، کاتالاز منفی و هوموفرمنتاتیو قادر به رشد در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد بودند. آن دسته از باکتریهایی که قادر به رشد در دمای ۴۵ درجه وغلظت نمک ۶/۵٪ نبودند، به عنوان جنس لاکتوکوکوس در نظر گرفته شدند (Edalatian *et al*., 2012). آزمون هیدرولیز آرژنین وتولید استوئین در تست VP وتخمیر کربوهیدراتها به عنوان آزمونهای تاییدی بیشتر وشناسایی تا مرحله گونه و زیر گونه صورت گرفت.

کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، هوموفرمانتاتیو قادر به رشد در دمای ۱۰و۴۵ درجه سانتیگراد ونیز قادر به رشد در غلظت ۶/۵ درصد نمک و pH=۹/۶ به عنوان جنس انتروکوکوس در نظرگرفته شدند(Edalatian *et al*., 2012 ؛ Navidghasemizad *et al*., 2009).

کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی هوموفرمنتاتیو با آرایش سلولی تتراد به عنوان پدیوکوکوس وکوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز

منفی هتروفرمنتاتیو که قادر به هیدرولیزآرژنین نبودند، به عنوان لویکونستوک در نظر گرفته شدند (Edalatian *et al*., 2012; Navidghasemizad *et al*., 2009).

برای باکتری‌های میله ای شکل گرم مثبت وکاتالازمنفی،رشد در دمای ۱۵و۴۵ درجه سانتیگراد ونیز تولید گاز CO_2 از گلوکز در لوله دورهام صورت گرفت (Edalatian *et al*., 2012; Navidghasemizad *et al*., 2009).

در پایان، پس از شناسایی جدایه ها در سطح جنس با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و تاییدی، آزمون تخمیر قند وکربوهیدراتها با استفاده از دستورالعمل API و شرکت سازنده صورت پذیرفت. به طوری که جهت ایزوله‌های تائید شده به عنوان لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس ، پدیوکوکوس ولویکونوستوک از کیت و روش API 50 CH وجهت ایزوله‌های تائید شده به عنوان انتروکوکوس از کیت و روش API 20 STREP استفاده گردید.

آنالیز آماری

پروفایل‌های بدست آمده توسط کیت های API 50 CH و API 20 STREP با کمک ضریب Simple Matching Coefficient با هم مقایسه و با آنالیز UPGMA[1] و برنامه Multi-Variate – Statistical Package خوشه بندی[2] شدند.

داده‌های حاصل از جمعیت ارگانیسم هابه صورت لگاریتمی (log cfu/g) در نرم افزار Minitab مورد آنالیز واریانس قرار گرفته و میانگین‌های حاصل در نرم افزار MSTATC مورد مقایسه میانگین با آزمون LSD قرار گرفته و سطوح معنی داری درسطح معنی دار ۹۵ درصد با حروف a,b,c,… مشخص شدند.

نتایج وبحث

توزیع فراوانی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از محیط کشت‌های مختلف برای پنیر کوزه (در دو مرحله) در جدول ۱ ، ارائه شده است.

نکته مهمی که از این جدول نتیجه می‌شود، انتخاب پذیری و مناسب بودن محیط‌های کشت مختلف جهت باکتری‌های اسید لاکتیک است. باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس به طورقابل ملاحظه ای درمحیط MRS آگار غالب بوده اند (۸ از ۱۴) به طوری که بیش از نیمی ازایزوله ها بر روی این محیط کشت لاکتوباسیلوس بودند (۸ از ۱۴) وما بقی باکتری‌های کوکسی شکل را شامل می‌شدند. بنابراین می‌توان گفت که این محیط برای باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس مناسب بوده است. نتایج مشابهی برای پنیر تولوم گزارش شده است (Erdogan and Gurses, 2006 ،).

برخی محققان (Lopez- Diaz *et al*., 2000) گزارش کردند که فراوانی باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس و بعد از آن لاکتوکوکوس در محیط MRS آگار بیش از سایر جنس‌های خانواده اسیدلاکتیک باکتری ها بوده است. اما از طرف دیگر حضور سایر باکتری ها مانند کوکسی شکل ها را در این محیط کشت می‌توان این گونه توجیه نمود که انتخاب پذیری پایین این محیط، اجازه رشد باکتریهای سایر جنس ها را می‌دهد (Caridi, 2003). در خصوص محیط M17 ، علیرغم انتخاب پذیری بالای این محیط برای جنس لاکتوکوکوس (Fox *et al*., 2000)، بیش از نیمی ازباکتری‌های جداشده از این محیط کشت متعلق به جنس انتروکوکوس بودند (۱۲از۱۹)(جدول۱). برخی محققان دیگر نیز نتایج مشابهی را با این محیط کشت بدست آورده اند (Navidghasemizad *et al*., 2009 ، Gurses and Erdogan, 2005 ؛).

روند تغییرات باکتریهای لاکتیک برحسب log cfu/ml(g) در محیط‌های کشت مختلف مورد استفاده برای باکتریهای اسیدلاکتیک در سه دمای ۳۰،۳۷و۴۵ درجه سانتیگراد در دو مرحله پنیرتازه (یک روزه) ورسیده (۹۰ روزه) در جدول ۲،ارائه شده است. درمحیط MRS در هر سه دما، یک روندکاهشی پنیرتازه نسبت به پنیر رسیده مشاهده شد که معنی دار نبود (P< ۰/۰۵). این روند کاهشی از مرحله پنیر تازه به پنیر رسیده در مورد پنیر لیقوان در تحقیقات نوید قاسمی زاد و همکاران (۲۰۰۹) مشاهده گردید. در دو محیط کشت M17 وKAA در هر سه دما،شاهد یک روند افزایشی اما به لحاظ آماری بی معنی می‌باشد (P< ۰/۰۵). این روند افزایشی از پنیر تازه به رسیده کاملاً قابل انتظار وتوجیه بوده، چراکه اولاً باتوجه به داده‌های جدول ۱، طیف غالب باکتری‌های جدا شده از این دو محیط کشت، باکتری‌های جنس انتروکوکوس بوده‌اند (جدول۱)، ثانیاً براساس گزارش ها می‌توان روند افزایشی را درجنس انتروکوکوس ازابتدای دوره رسیدن تا انتهای آن مشاهده کرد، بطوری که در پنیرهای رسیده از این دست (پنیرهای حاصل از شیر خام) انتروکوکوس ها فلور غالب راتشکیل می‌دهند (Lopez- Diaz *et al*., ؛ Gurses and Erdogan , 2005 2000). در این میان، فقط در محیط MRS+Van ودر دمای ۳۰ درجه سانتیگراد روند افزایشی معنی داری مشاهده گردید(P< ۰/۰۵). یکی از نکات قابل توجه درمورد باکتری‌های انتروکوکوس از این جهت است که رشد سایر باکتری‌های اسیدلاکتیک رابوسیله هیدرولیز کازئین ها به الیگوپپتیدها، تحریک می‌کنند (Ohta and Boubekri ، 1996). دلیل ارتباط کاهش شمارش باکتری ها در محیط MRS با تحریک رشد باکتری‌های لاکتیکی توسط انتروکوکوس ها را می‌توان این گونه توجیه نمود که اولاً در محیط کشت‌های MRS اکثر کلنی‌های رشد کرده، متعلق به جنس لاکتوباسیلوس بودند.

1- Unweighted pair groups average linkage analysis
2- Cluster

جدول۱- توزیع باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از محیط کشت‌های مختلف در پنیرتازه ورسیده کوزه از تعداد ده نمونه

محصول	جنس‌های باکتری	محیط کشت				
		MRS	MRS+Vancomycin	M17	KAA	مجموع
پنیرتازه	لاکتوباسیلوس	۲	–	–	۱	۳
	لاکتوکوکوس	۱	–	۳	–	۴
	انتروکوکوس	–	–	–	۱	۱
	پدیوکوکوس	۱	–	–	–	۱
	آئروکوکوس	–	–	–	–	–
پنیررسیده	لاکتوباسیلوس	۶	۳	۴	–	۱۳
	لاکتوکوکوس	۲	–	–	–	۲
	انتروکوکوس	۲	–	۱۲	۸	۲۲
	پدیوکوکوس	–	–	–	–	–
	آئروکوکوس	–	–	–	۲	۲
	مجموع	۱۴	۳	۱۹	۱۲	۴۸

به همین دلیل در طول رسیدگی تعداد آنها کاهش نشان داده است و باکتری‌های متعلق به جنس انتروکوکوس در این محیط رشد نداشته و یا رشد کمتری داشته اند، بنابراین تعداد انتروکوکوس ها در این محیط کشت (MRS) آنقدر زیاد نبوده است که بتواند از طریق خاصیت پروتئولیتیکی که دارد، باعث افزایش رشد باکتریهای این محیط کشت (که اغلب متعلق به جنس لاکتوباسیلوس بوده اند، بر اساس جدول ۱) گردد. ثانیاً، منظور از تحریک رشد باکتریهای لاکتیکی که در اثر خاصیت پروتئولیتیکی انتروکوکوس ها، رخ می‌دهد، بیشتر تحریک باکتریهای مولد گاز به تولید گاز بیشتر(مانند لویکونوستوک ها) و تولید اسید بیشتر توسط لاکتوکوکوس ها بوده است (Lopez-Diaz *et al*., 2000).

از داده ها واطلاعات جدول ۳ ، به عنوان آزمونهای تاییدی برای شناسایی ایزوله ها تا سطح جنس استفاده گردید.به عنوان مثال، جدایه‌هایی که قادر به رشد در دمای ۱۵ بوده اما در دمای بالا (۴۵) و غلظت نمک بالا (۶/۵ درصد) رشد نمی کردند، به عنوان جنس لاکتوکوکوس وآن دسته که رشد در دمای ۴۵ درجه وغلظت نمک ۶/۵٪، همچنین رشد در pH =۹/۶ را نشان دادند، به عنوان جنس انتروکوکوس شناسایی شدند (Edalatian *et al*., 2012 ؛ Navidghasemizad *et al*., 2009).

جدول۲- تغییرات تعداد کلنی ها در محیط‌های کشت مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک درپنیرکوزه تازه ورسیده بر حسب , log cfu/g log cfu/mL میانگین وانحراف معیار آنها

محیط کشت	درجه حرارت اینکوباسیون	پنیرتازه	پنیررسیده
MRS	۳۰	۶/۸۷± ۰/۰۴^{abc*}	۶/۷۴± ۰/۰۷^{abc}
	۳۷	۶/۹۳± ۰/۰۲^{abc}	۶/۸± ۰/۰۵^{abc}
	۴۵	۵/۹۲± ۰/۲۱^{cd}	۵/۵± ۰/۰۴^{cd}
MRS+ vancomycin	۳۰	۱^{e}	۵/۶۵± ۰/۴۹^{cd}
	۳۷	۱^{e}	۱^{e}
	۴۵	۱^{e}	۱^{e}
M17	۳۰	۶/۶۲± ۰/۰۳^{abcd}	۶/۹± ۰/۰۶^{abc}
	۳۷	۶/۰۸± ۰/۱۲^{cd}	۶/۶۲± ۰/۱۶^{abcd}
	۴۵	۷/۶۱± ۰/۰۱^{ab}	۷/۷۹± ۰/۰۲^{a}
KAA	۳۰	۵/۱۵± ۰/۲۱^{d}	۶/۰۳± ۰/۳۷^{cd}
	۳۷	۵/۶۸± ۰/۱۲^{cd}	۶/۰۰± ۰/۰۰^{cd}
	۴۵	۵/۹۲± ۰/۱۱^{cd}	۶/۱۲± ۰/۲۴^{bcd}

*- حروف متفاوت در هر سطر و ستون نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

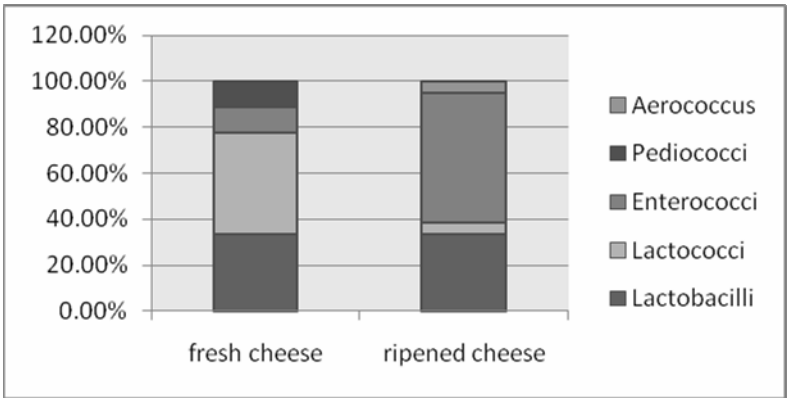
جدول ۳- خصوصیات بیوشیمیایی اسیدلاکتیک باکتری‌های جدا شده از پنیر کوزه تازه و رسیده

خواص بیوشیمیایی / نژادها	رشد در C ۱۵°	رشد در C ٤٥°	رشد در ٦/٥ ٪ نمک	رشد در pH 9.6	تولید گاز از گلوکز	تست VP	هیدرولیز آرژنین	مصرف سیترات
Lac.lactis ssp. lactis	+	-	-	-	-	+	+	-
*Lb.*plantarum	+	-	+/-	+	-	-	-	-
Lb.brevis	+	-	-	+/-	+	-	+	-
Lb. lindneri	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd
Lb.helveticus	-	+	nd	nd	-	nd	-	nd
Lb. delbrueckeii ssp. *delbrueckeii*	-	+	+	+	-	-	-	-
Lb.pentosus	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lb.fermentum	-	+	nd	nd	+	nd	+	nd
Pediococcus sp.	+	-	+	-	-	+	+	-
Ent. faecium	+	+	+	+	-	+	+	-
Ent.faecalis	+	+	+	+	-	+	+	-
Ent.avium	+	+	+	+	-	+	-	nd
Ent.durans	+	+	+	+	-	+	+	-
Aerococcus viridans	+	-	+	+	-	nd	nd	nd

nd: تعیین نشده

شکل ۱، روند تغییرات (فراوانی سویه‌های جداشده) هر یک ازجنس‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک را در مراحل پنیرتازه ورسیده نشان می‌دهد. همانطور که ملاحظه می‌شود در پنیر تازه، جنس لاکتوکوکوس فلور غالب را تشکیل می‌دهد. در پنیر رسیده لاکتوکوکسی ها توسط باکتری‌های جنس انتروکوکوس جایگزین می‌شوند. این الگو وروند در اکثر پنیرهای سنتی وحاصل ازشیرخام مشاهده شده است و منطقی به نظر می‌رسد(Lopez- Diaz *et al.*, 2000 ؛ Navidghasemizad *et al.*, 2009 ؛ Gurses and Erdogan 2005). چراکه لاکتوکوکوس ها درآغازفرایند طیف غالب فلورلاکتیکی را تشکیل می‌دهند که مسئول اسیدیفیکاسیون شیر بوده و منجربه تولید دلمه می‌شوند و پس از آن فلورلاکتیکی تغییر می‌یابد و انتروکوکوس ها ولاکتوباسیلوس ها غالب شده و در فرایند رسیدن شرکت می‌کنند (Gurses and Erdogan, 2005).

توزیع باکتریهای اسیدلاکتیک در پنیر تازه و رسیده کوزه، در جدول۴، نشان داده شده است. در پنیر تازه، جنس لاکتوکوکوس (۴۴/۴۴ درصد) و پس از آن لاکتوباسیلوس (۳۳/۳۳ درصد) بیشترین فراوانی یا تعداد را به خود اختصاص می‌دهند. در این بین گونه‌های *Lb. Plantarum* و*Lac. lactis* ssp. *lactis* (۴۴/۴۴ درصد) (۲۲/۲۲ درصد) و*Lb. brevis* (۱۱/۱۱ درصد) به ترتیب بالاترین فراوانی رانشان می‌دهند. در پنیر رسیده جنس *Enterococcus* (۵۶/۴۱٪) و در این بین گونه‌های *faecium* (۴۳/۸۵ درصد) و*faecalis* (۷/۶۹ درصد) بالاترین فراوانی را به خود اختصاص می‌دهند.



شکل۱- تغییرات جنس‌های مختلف اسید لاکتیک باکتری ها (بر حسب درصد یا تعداد سویه‌های جدا شده از ده نمونه محصول) در پنیرکوزه تازه ورسیده

جدول ٤- توزیع باکتری‌های اسیدلاکتیک در پنیر کوزه تازه و رسیده بر اساس خصوصیات فنوتیپیک (API 50 CH, API 20 STREP)

گونه‌های باکتریهای لاکتیکی	مراحل تولید		مجموع(٪)*
	پنیرتازه (٪)	پنیررسیده(٪)	
Lactobacillus sp.	۳ (۳۳/۳۳)	۱۳ (۳۳/۳۳)	۱۶ (۳۳/۳۳)
Lb. plantarum	۲ (۲۲/۲۲)	۲ (۵/۱۲)	۴ (۸/۳۳)
Lb. brevis	۱ (۱۱/۱۱)	۵ (۱۲/۸۲)	۶ (۱۲/۵)
Lb. lindneri	-	۱ (۲/۵۶)	۱ (۲/۰۸)
Lb. helveticus	-	۱ (۲/۵۶)	۱ (۲/۰۸)
Lb. delbrueckii spp. *delbreuckeii*	-	۲ (۵/۱۲)	۲ (۴/۱۶)
Lb. pentosus	-	۱ (۲/۵۶)	۱ (۲/۰۸)
Lb. fermentum	-	۱ (۲/۵۶)	۱ (۲/۰۸)
Lactococcus sp.	۴ (۴۴/۴۴)	۲ (۵/۱۲)	۶ (۱۲/۵)
Lac. lactis ssp. *lactis*	۴ (۴۴/۴۴)	۲ (۵/۱۲)	۶ (۱۲/۵)
Pediococcus sp.	۱ (۱۱/۱۱)	-	۱ (۲/۰۸)
Enterococcus sp.	۱ (۱۱/۱۱)	۲۲ (۵۶/۴۱)	۲۳ (۴۷/۹۱)
Ent. faecium	۱ (۱۱/۱۱)	۱۷ (۴۳/۵۸)	۱۸ (۳۷/۵)
Ent. faecalis	-	۳ (۷/۶۹)	۳ (۶/۲۵)
Ent. avium	-	۱ (۲/۵۶)	۱ (۲/۰۸)
Ent. durans	-	۱ (۲/۵۶)	۱ (۲/۰۸)
Aerococcus sp.	-	۲ (۵/۱۲)	۲ (۴/۱۶)
Aerococcus viridans	-	۲ (۵/۱۲)	۲ (۴/۱۶)
مجموع(٪)	۹ (۱۰۰)	۳۹ (۱۰۰)	۴۸ (۱۰۰)

*- اعداد داخل پرانتز نشان دهنده درصد باکتری ها هستند.

روند مشابهی در انتروکوکوس‌های پنیرهای تولوم و پنیرتولوم کپکی آبی تولید شده با *Penicillium roqueforti* مشاهده شده است (Erdogan and Gurses ; Gurses and Erdogan, 2005 ، 2006).

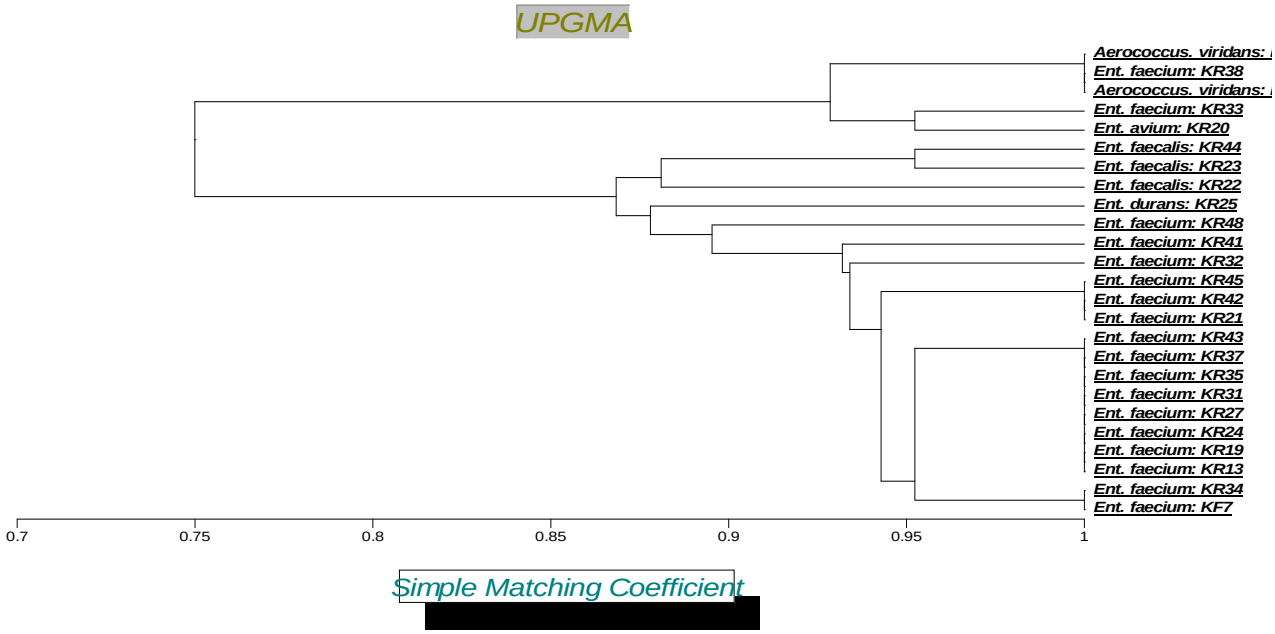
پس ازجنس انتروکوکوس در پنیررسیده، بالاترین فراوانی متعلق به جنس لاکتوباسیلوس (۳۳/۳۳ درصد) گونه‌های *brevis* (۱۲/۸۲ درصد) و *plantarum* (۵/۱۲ درصد) می‌باشد. حضور سایرگونه‌های جنس لاکتوباسیلوس هرچندبافروانی کمتر قابل توجه است. به عنوان مثال، حضور برخی لاکتوباسیلوس‌های هتروفرمنتاتیو مانند *Lb. brevis* و *Lb. fermentum* در این پنیرمی باشد که در سایر پنیر ها نیز گزارش شده است (Barouei *et al*., 2008). همچنین پیدایش برخی لاکتوباسیلوس‌های ترموفیل نظیر *Lb. helveticus* و *Lb. fermentum* و*Lb.delbrueckii* spp *delbrueckii* در پنیررسیده کوزه قابل تامل است. *Lb. lindneri* نیز یک گونه نادر است که در این پنیر رسیده شناسایی شد. همانطور که ملاحظه می‌گردد داده‌های موجود در این جدول وروند تغییرات گونه‌های شناسایی شده در دو پنیر تازه ورسیده مشابه روند حاصل از جداول قبلی بوده و تائیدی بر نتایج بدست آمده می‌باشد. در اکثر مطالعات اشاره شده است که لاکتوکوکسی ها، لاکتوباسیلوس‌های هتروفرمنتاتیو اختیاری[1]، که همواره در ارتباط با انتروکوکوس ها هستند، گروه‌های میکروبی عمده ای هستند که در این گونه پنیرها حضور دارند (Comunian *et al*., 2010).

پروفایل تخمیر کربوهیدرات

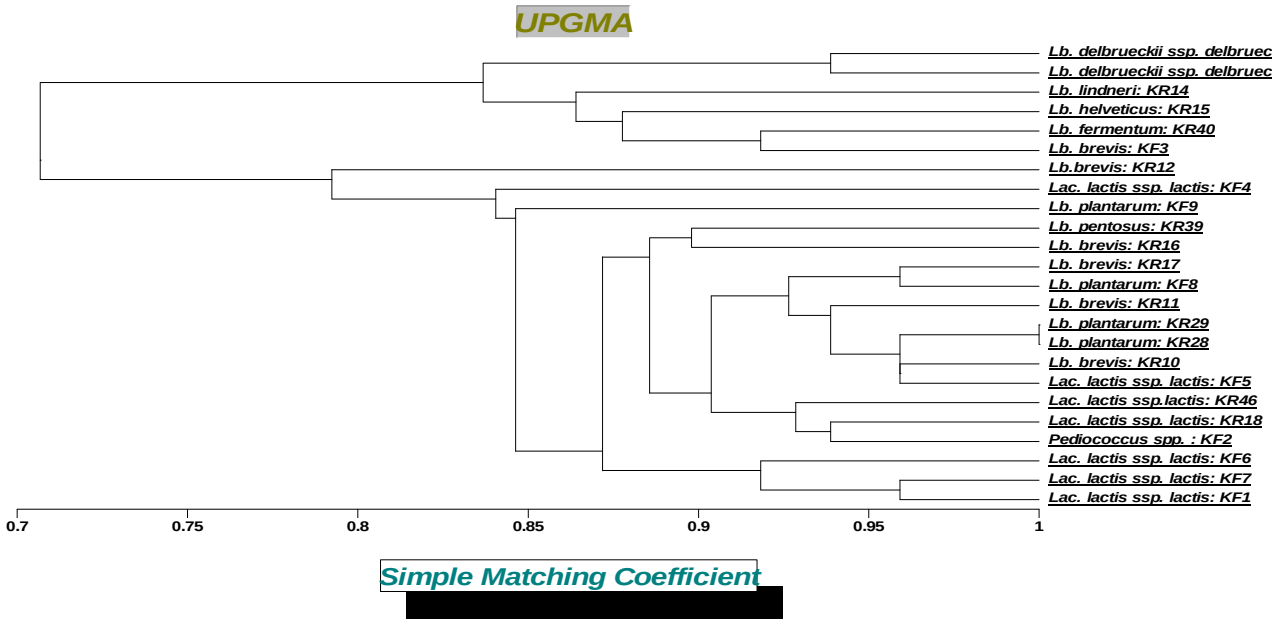
درمجموع،۱۳پروفایل متفاوت تخمیر کربوهیدرات با استفاده از کیت‌های API 20 TREP مشاهده شد (شکل۲). براساس نتایج آنالیز آماری و دندوگرام حاصل از آنالیز UPGMA، درجه بالایی از مشابهت دیده شد. (با استفاده از ضریب هماهنگ کننده ساده[2]).

با کمک کیت‌های API 50 CHL در مجموع ،۲۳ الگوی مختلف تخمیر قند مشاهده شد. دندوگرام بدست آمده پس از آنالیز UPGMA در شکل ۳ نشان داده شده است. (با استفاده ازضریب هماهنگ کننده ساده).

1- Facultatively Heterofermentative Lactobacilli (FHL)
2- Simple Matching Coefficient



شکل۲- دندوگرام پروفایل تخمیر کربوهیدرات که توسط سیستم API 20 STREPبدست آمده است. ماتریس مشابهت پروفایل ها ، بوسیله روش UPGMA Clustering مورد آنالیز کلاستر قرار گرفت. کدها : (KF(Koozeh Fresh),KR(Koozeh Ripened. خطوط عمودی دندوگرام نشان دهنده میزان شباهتی است که گروه‌های متصل شده به هم بوسیله این خطوط دارند.



شکل۳- – دندوگرام پروفایل تخمیر کربوهیدرات که توسط سیستم API 50CH بدست آمده است. ماتریس مشابهت پروفایل ها ، بوسیله روش UPGMA Clustering مورد آنالیز کلاستر قرار گرفت. کدها:(KF(Koozeh Fresh),KR(Koozeh Ripened .خطوط عمودی دندوگرام نشان دهنده میزان شباهتی است که گروه‌های متصل شده به هم بوسیله این خطوط دارند.

نتیجه گیری

در بین گونه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک پیداشده در نمونه‌های موردآزمایش، که جنس‌های متعلق بـه انتروکوکـوس، لاکتوباسـیلوس ولاکتوکوکوس، جمعیت اصلی لاکتیکی در پنیرکـوزه تـازه ورسـیده را تشکیل می‌دادند. انتروکوکوس ها، به ویژه در پنیر رسیده فلـور غالـب بودند. بطوریکه انتروکوکوس ها روند افزایشی ولاکتوکوکوس ها روند نزولی را در انتهای رسیدن نـشان دادنـد.همچنـین گونـه‌هـای *Lac. lactis* ssp. *lactis* ، *Ent. faecalis* ، *Ent. faecium* و*Lb.plantarum* و*Lb. brevis* نسبت به سـایر گونـه هـا، در تعـداد بالاتری شناسایی شدند.این حقیقت بر این امـر دلالـت دارد کـه ایـن گونه ها می‌توانند نقش مهمی در تولید ورسیدگی پنیر بازی کننـد. بـه منظور کاربرد این نژادها در مقیاس صنعتی ، بایـد توجـه بیـشتری بـه شناسایی دقیق تر این گونه ها در سطح زیرگونه معطوف گردد. جهـت دستیابی به این هدف، تکنیک‌های دقیق تری مانند روشهای مولکولی مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله، از شرکت محترم صـنایع لبنـی رضـوی جهـت حمایت مالی این پروژه کمال تشکر و سپاسگزاری را دارد. همچنین از همکـاری جنـاب آقـای مهنـدس حـسامی راد، عـضوهیات علمـی مرکزتحقیقات جهادکشاورزی اسـتان آذربایجـان غربـی در خـصوص کمک در جمع آوری نمونه‌هـای پنیرکـوزه در مراحـل مختلـف و نیـز ازاستاد محترم جناب آقای دکتر خمیری جهت ارسال و در اختیار قـرار دادن برخی ایزوله‌های باکتری های اسید لاکتیک، قدردانی می‌گردد.

منابع

موسوی پور، ف.، برازجانی، م. وحسامی راد، ر.، ۱۳۸۸، بررسی تاثیر منطقه تولید وزمان نگهداری برتغییرات ماده خشک، چربی و اسیدهای چـرب پنیرکوزه ای آذربایجان غربی. مجله پژوهشهای علوم دامی کشور،۳، ۴۹-۵۵.

Abdi, R., Shikh-Zeinoddin, M., Soleimanian-Zad, S., 2006, Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian Lighvan cheese. Pakistan Journal of Biological Sciences **9**, 99-103.

Barouei, J., Karbassi, A., Ghoddusi, H. B., Mortazavi, A., 2008, Lactic microflora present in Liqvan ewe's milk cheese. International Journal of Food Properties 11, 407-414.

Boubekri, K., Ohta, Y., 1996, Identification of lactic acid bacteria from Algerian traditional cheese, El-Klila. Journal of the Science of Food and Agriculture, 70, 501-505.

Caridi, A., 2003, Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from the artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. International Journal of Dairy Technology. 56, (2), 105-110.

Colombo, F., Borgo, F., and Fortina, M. G., 2009, Genotypic characterization of non starter lactic acid bacteria involved in the ripening of artisanal Bitto PDO cheese. Journal of Basic Microbiology, 49, 521-530.

Comunian, R., Paba, A., Daga, E., Dupre, I., and Scintu, M. F., 2010, Traditional and innovative production methods of Fiore Sardo cheese: a comparison of microflora with a PCR- culture technique. International Journal of Dairy technology, 63 (2), 224-233.

Durlu- Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., and Litopoulou-Tzanetaki, E., 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. Journal of applied microbiology, 91, 861-870.

Edalatian, M. R., Habibi Najafi, M. B., Mortazavi, A., and Mayo, B., 2012, The biodiversity and evolution of lactic flora during ripening of the Iranian semi-soft Lighvan cheese. International Journal of Dairy technology, **65(1)**,81-89.

Erdogan, A., Gurses, M., 2005, Lactic acid bacteria isolated from blue mouldy Tulum cheese produced with Penicillium roqueforti . International Journal of Food Properties, **8**, 405-411.

Fox, P. F., McSweeney , P., Cogan, T. M., and Guinee, T. P., 2000, Fundamentals of Cheese Science. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers , pp. 536–539.

Gurses, M., and Erdogan, A., 2006, Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Tulum Cheese during Ripening Period. International Journal of Food Properties, 9(3), 551–557.

Kafili, T., Razavi, S. H., Emam Djomeh, Z., Naghavi, M. R., Álvarez-Martín, P., and Mayo, B., 2009, Microbial characterization of Iranian traditional Lighvan cheese over manufacturing and ripening via culturing and PCR-DGGE analysis: identification and typing of dominant lactobacilli. European Food Research technology, 229, 83-92.

Lopez-Diaz, T. M., Alonso, C., Roman, C., Garcia-Lopez, M. L., and Moreno, B., 2000, Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. Food Microbiology, 17(1), 23-32.

Navidghasemizad, S., Hesari, J., Saris, P., and Nahaei, M. R., 2009, Isolation of lactic acid bacteria from Lighvan cheese, a semi hard cheese made from raw sheep milk in Iran. International Journal of Dairy Technology, **62**,(**2**), 260-264.