

جداسازی و شناسایی سویه‌های انتروکوکوسی غالب در پنیر سنتی ليقوان

هانیه رسولی پیروزیان^۱، جواد حصاری^{۲*}، صفر فرج نیا^۳، محمد مقدم^۴ و شیوا قیاسی فر^۲

تاریخ پذیرش: 87/12/12

1- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

2- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

3- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

4- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

E-mail: Jhesari@tabrizu.ac.ir

* مسئول مکاتبه

چکیده

هدف این تحقیق جداسازی و شناسایی سویه های انتروکوکوس از پنیر سنتی ليقوان بود. چهار نمونه پنیر سنتی از چهار واحد تولیدی پنیر در منطقه ليقوان با چهار تکرار تهیه شد. سپس توسط روش های استاندارد میکروبیولوژیکی و استفاده از محیط کشت اختصاصی کانامایسین اسکولین آزید آگار، سویه های انتروکوکوس جداسازی و توسط روش های بیوشیمیایی شناسایی گردیدند. برای شناسایی گونه ها از آزمون تخمیر قند با شش نوع قند رافینوز (D)، سوربیتول (D)، آرابینوز (L)، لاکتوز (D)، ملی بیوز (D) و سوربوز (D) استفاده شد. آزمون های کاتالاز و تشکیل لخته بر روی سویه های جداسازی شده انجام گرفت. نتایج نشان داد که 20 سویه جداسازی شده از چهار نوع پنیر سنتی، 19 سویه کاتالاز منفی و تنها یک سویه کاتالاز مثبت بود. برخی از سویه های انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس در محلول شیر خشک، پس از گرمابخانه گذاری در دمای 37 درجه سانتیگراد بمدت 16 ساعت تشکیل لخته دادند. نتایج نشان دادند که سویه های غالب در نمونه های 1، 2، 3 و 4 پنیر تهیه شده به ترتیب، انتروکوکوس فکالیس، چهار سویه از پنج سویه انتروکوکوس فاسیوم، چهار سویه از پنج سویه انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم بودند.

واژه‌های کلیدی: انتروکوکوس فاسیوم، انتروکوکوس فکالیس، پنیر ليقوان، تخمیر قند، تشکیل لخته، کاتالاز

Isolation and Identification of Dominant Strains of *Enterococci* in Traditional Lighvan Cheese

H Rasouli Pirouzian¹, J Hesari^{2*}, S Farajnia³, M Moghaddam⁴ and Sh Ghiassifar²

¹Former MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author: E-mail: Jhesari@tabrizu.ac.ir

Abstract

The objective of this study was to isolate and identify dominant strains of *Enterococci* in traditional Lighvan cheese. Samples of cheese were provided from four different cheese production units in Lighvan region. Strains of *Enterococci* in these samples were isolated by standard microbiology methods and selective medium of Kanamycin Esculin Azide Agar (KAA) and, then identified by biochemical methods. To identify Species of *Enterococci*, Sugar fermentation test was performed by using six sugar types including *Arabinose* (L), *Raffinose* (D), *Lactose* (D), *Sorbitol* (D), *Sorbose* (D) and *Melibiose* (D). Catalase and curd formation tests were done on isolated strains. The results indicated that the 20 isolated strains from four types of cheeses 19 strains were Catalase negative and only one strain was Catalase positive. Some of *E. faecium* and *E. faecalis* strains which incubated in milk powder solution at 37°C for 16 hours separated curd from whey. The results showed that dominant strains in 1, 2, 3 and 4th cheese samples were *E. faecalis*, four from five strains were *E. faecium*, four from five strains were *E. faecalis* and *E. faecium* respectively.

Keywords: Catalase, Curd formation, *E. faecium*, *E. faecalis*, Sugar fermentation

مقدمه

مانند محصولات لبنی حضور دارند. آنها هم چنین قسمتی از فلور میکروبی طبیعی روده بعضی از پستانداران و انسان را تشکیل می دهند (گیرافا 2003). تعداد قابل توجهی از سویه های متعلق به گونه های متفاوت جنس انتروکوکوس دارای خواص بیولوژیکی یکسان مانند تولید باکتریوسین و رفتارهای پروبیوتیکی هستند. چنین باکتری هایی قادرند که

باکتری های جنس انتروکوکوس ارگانیزم هایی گرم مثبت، کاتالاز منفی، تخم مرغی شکل و غیر اسپورزا، بی هوازی اختیاری و هموفرمانتاتیو با احتیاجات غذایی پیچیده هستند (هیوکی 1998) که اغلب در اکثر سبزیجات، گیاهان و مواد غذایی به ویژه غذاهای با منشأ حیوانی

مواد آنتی میکروبیال (اسید لاکتیک، اسید استیک، اتانول، دی اکسید کربن، دی استیل) می‌کنند (فولکوی مورنو و همکاران 2006).

سویه ای از انتروکوکوس به نام *E. faecium SF68* به عنوان پروبیوتیک در سوئیس استفاده شده است که اثر کلینیکی موثری در جلوگیری از اسهال دارد و در فرآیند درمان اسهال در کودکان موثر شناخته شده است. اخیراً کمیته نظارت بر مواد غذایی در انگلیس¹ استفاده از سویه *E. faecium K77D* را به عنوان استارتر محصولات لبنی تخمیری تایید نموده است (فولکوی مورنو و همکاران 2006).

باکتری‌های اسید لاکتیک توانایی تجزیه ترکیبات شیر به ترکیبات فرار و معطر را دارند و به همین منظور نقش مهمی در تکوین طعم و آرومای پنیر دارا هستند. تجزیه لاکتوز و سیترات طی رسیدگی پنیر باعث تولید ترکیبات فرار مانند استالدئید، اتانول، دی استیل، استون و استوئین می‌شود که منجر به تکوین آروما می‌گردد. ترکیب فرار عمده تولید شده در شیر توسط سویه‌های انتروکوکوس فکالیس، فاسیوم و دورانس، استالدئید، اتانول و استوئین است. سویه‌های انتروکوکوس فکالیس و به مقدار کمتر انتروکوکوس فاسیوم، بیشترین مقدار این ترکیبات را تولید می‌کنند که اکثر آنها دارای منشا غذایی هستند (سونی و همکاران 2003).

حضور انتروکوکوس در مقادیر بالا در پنیرهای مختلف و اثر آنها در کمک به بهبود ویژگی‌های ارگانولپتیکی مواد غذایی تخمیری و توانایی آنها در تولید باکتریوسین‌ها (انتروسین) خصوصیات مهمی هستند که باعث کاربرد آنها در تهیه مواد غذایی می‌گردد. با توجه به اینکه در ایران نیز پتانسیل‌های خوبی برای تولید و فرآوری محصولات لبنی وجود دارد و با توجه به ذائقه خاص مردم ایران، زمینه

به صورت کلونی‌های تورفته از بقیه متمایز شوند و به دلیل داشتن مقاومت بالا توانایی رشد در محیط خارج روده ای نیز دارند. از این رو در خاک، آب‌های سطحی، روی گیاهان و سبزیجات هم مشاهده شده‌اند (گیرافا 2002) و می‌توانند در محیط‌های هیپوتونیک، هیپرتونیک، اسیدی و قلیایی رشد کنند (هیوکی 1998). دوام انتروکوکوس در طی رسیدن پنیر می‌تواند به محدوده وسیع رشد در دماهای مختلف $10-45^{\circ}\text{C}$ و اسیدیته (pH = 4-9/6) و به تحمل نمک (با غلظت 6/5 درصد NaCl) نسبت داده شود (اوگیر و سرور 2007).

انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس دورانس گونه‌هایی هستند که بیشترین فراوانی را در بین سایر گونه‌ها به خود اختصاص داده‌اند و به طور فراوان در محصولات لبنی یافت می‌شوند. بنابراین می‌توانند نقش بسیار مهم در بافت و آرومای پنیر ایفا کنند (موراندی و همکاران 2006). انتروکوکوس به عنوان بخش مهمی از میکروفلور طبیعی بسیاری از فرآورده‌های لبنی تشخیص داده شده است و در بعضی از پنیرها، بر فلور لاکتوباسیل و لاکتوکوکوسی غالب است (سوزی و همکاران 2000).

انتروکوکوس کاربردهای مهمی در صنعت لبنیات دارد و در تکوین خصوصیات ارگانولپتیکی در طی رسیدن بسیاری از پنیرها نقش ایفا می‌کند. هم‌چنین از آن به عنوان مولفه اصلی در محیط کشت استارتر استفاده می‌شود (گیرافا 2002). انتروکوکوس می‌تواند دارای فعالیت‌های پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی باشد و بنابراین می‌تواند نقش بسیار مهمی در رسیدن پنیر ایفا کند (فولکوی مورنو و همکاران 2006). سویه‌های انتروکوکوس فکالیس فعالیت لیپولیتیکی و پروتئولیتیکی بیشتری نسبت به سایر سویه‌ها دارند. این میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی در طی نگهداری، تولید

¹ Advisory Committee on Novel Foods and Processes (ACNFP)

صورت تصادفی از پلیت‌هایی که به طور متوسط 100-30 کلونی در آنها شمارش شده بود، برداشته شد و مجدداً روی همان محیط کشت اختصاصی کانامایسین، سطحی کشت داده شدند (سوزی و همکاران 2000).

برای آزمون کاتالاز یک لوپ از کلونی جداسازی شده روی سطح استریل پخش گردید. سپس یک میلی لیتر پراکسید هیدروژن 3 درصد روی آن ریخته شد، بعد از اندکی تامل، در صورت وجود آنزیم کاتالاز حباب‌های اکسیژن از سطح کلونی متصاعد گردید (فاکس و همکاران 2000).

برای شناسایی گونه‌های انتروکوکوس، واکنش تخمیر قندها برای تمامی جنس‌های جداسازی شده انجام گرفت. محیط کشت پایه مورد استفاده شامل لوریا برات LB³ فاقد گلوکز و عصاره مخمر بود که به آن 0/01 درصد کروزل قرمز به عنوان شاخص تغییر pH افزوده شد. محلول 1 درصد قندهای مورد نظر در محیط کشت مزبور تهیه شد. سپس پارافین اضافه گردید تا تخمیر در شرایط کاملاً بی‌هوازی صورت گیرد (لوپز دیاز و همکاران 2000).

جهت بررسی مستقیم شکل باکتری‌ها از رنگ آمیزی گرم استفاده گردید. بدین منظور یک لوپ از کلونی جداسازی شده روی یک لام تمیز حاوی یک قطره آب مقطر استریل ریخته شد و کلونی روی آن پخش گردید. گسترش حاصله با حرارت دادن لام تثبیت شد، سپس چند قطره محلول کریستال ویوله روی لام ریخته شد و به مدت 2 دقیقه در وضعیت ساکن نگه داشته شده بعد از این مدت سطح لام به طور کامل با آب مقطر شسته شد و چند قطره محلول لوگل روی لام ریخته شد و پس از یک دقیقه لام دوباره با آب مقطر شسته داده شد و روی آن محلول 50 به 50 الکل - استون ریخته شد. بعد از مکث به مدت 30 ثانیه دوباره لام با آب مقطر شسته شد و چند قطره محلول فوشین یا سافرانین به روی لام اضافه گردید و پس از 15

های لازم برای بررسی و تحقیق بر روی سویه‌های بومی موجود در محصولات سنتی کاملاً احساس می‌گردد.

مواد و روش‌ها

در مرحله اول چهار نمونه پنیر سنتی ليقوان از چهار منطقه و کارگاه مختلف از روستای ليقوان واقع در جنوب شرقی استان آذربایجان شرقی با چهار تکرار (در روزهای متفاوت) تهیه شد. روش شناسایی باکتری‌های انتروکوکوس در این تحقیق مبتنی بر روش‌های فنوتیپی بود. با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی، سوش‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم جداسازی و تعیین هویت شدند. برای جداسازی باکتری‌های انتروکوکوس از محیط کشت اختصاصی کانامایسین اسکولین آزید آگار¹ به عنوان مناسب‌ترین محیط کشت برای شناسایی استفاده به عمل آمد. در این محیط وجود کانامایسین به عنوان عامل انتخابی مد نظر قرار گرفت. انتروکوکوس‌ها با هیدرولیز اسکولین تولید گلوکز و اسکولتین می‌کنند که در حضور سیترات فریک رنگ قهوه‌ای ایجاد می‌شود.

برای رقیق کردن نمونه‌ها، 5 گرم نمونه پنیر مورد نظر توزین و سپس با 10 میلی لیتر بافر PBS² مخلوط شد و به مدت چند دقیقه مخلوط و یکنواخت گردید. سپس بقیه غلظت‌ها از محلول همگن حاصل در اپندورف‌های حاوی 900 مایکرولیتر PBS 0/1 درصد استریل تهیه شد. رقت‌های 10^{-1} ، 10^{-2} و 10^{-3} در بافر PBS تهیه گردیدند. مقدار 300 میکرولیتر از هر رقت در یک پلیت کانامایسین اسکولین آگار پخش شد و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد گرما گذاری گردید. کلونی‌های رشد یافته در هر پلیت پس از سپری شدن مدت گرماخانه گذاری مورد شمارش قرار گرفتند. سپس پنج کلونی به

¹Kanamycin aesculin azide agar (Merck)

²Phosphate buffer saline

³Luria- Bertani media

رنگ آمیزی گرم

نتایج حاصل از رنگ آمیزی گرم بر روی نمونه‌ها نشان داد که تمامی 20 سویه جداسازی شده از چهار نوع پنیر سنتی ليقوان، گرم مثبت بودند.

واکنش تخمیر فندها

به طور کلی برای شناسایی گونه‌های انتروکوکوس، آزمون مقاومت و تخمیر قند پیشنهاد شده است. از طرف دیگر گزارش شده است که استفاده از تیروزین دکربوکسیلاز، یک آزمون مناسب برای تشخیص انتروکوکوس از استرپتوکوکوسی می باشد. اما به علت حلالیت کم تیروزین برای آزمایشات روتین مناسب نیست (لی 1972). شناسایی گونه‌های ویژه از جنس استرپتوکوکوس و انتروکوکوس توسط آزمون‌های فنوتیپیک سنتی در بسیاری از موارد امکان پذیر می باشد، هرچند در بین برخی گونه‌های یک گروه جواب نمی دهد (هاردی و وایلی 1997).

نتایج حاصل از آزمون تخمیر قند نشان داد که انتروکوکوس فکالیس برای پنیر اول (جدول 1) و انتروکوکوس فاسیوم برای پنیر چهار (جدول 4)، گونه‌های غالب بودند. بدین معنی که از پنج کلونی که به تصادف برداشته شد و کشت داده شدند، هر پنج کلونی انتروکوکوس فاسیوم بودند. در پنیر دوم از پنج گونه جداسازی شده چهار گونه انتروکوکوس فاسیوم (جدول 2) و در پنیر سوم چهار گونه انتروکوکوس فکالیس (جدول 3) بودند.

ثانیه با آب شستشو داده شد. بعد از خشک کردن لام یک قطره روغن ایمرسیون روی لام ریخته شد و بررسی میکروسکوپی با عدسی 100 انجام گردید (فاکس و همکاران 2000).

پس از تهیه محلول (10%) شیر خشک بدون چربی، سویه‌های انتروکوکوس فکالیس و فاسیوم به طور جداگانه در محلول فوق کشت داده شد و به مدت 1 شبانه روز گرما گذاری شدند. روز بعد مشاهده شد که سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم محلول را 2 فازه نموده اند.

همچنین برای مشخص نمودن مقاومت سویه‌های جداسازی شده به 10 نوع آنتی بیوتیک از آزمون آنتی بیوگرام استفاده گردید. بدین منظور محیط مولر هینتون¹ به کار برده شد. ابتدا سویه‌های انتروکوکوس در محیط لوریا برات LB کشت داده شده و غلظت کشت معادل 0/5 لوله‌های مک فارلند تنظیم گردید. سپس یک سوپ پنبه‌ای در محیط فوق غوطه‌ور گردیده و پس از گرفتن مایع اضافی بر روی محیط مولر هینتون به صورت یکنواخت پخش گردید. پس از جذب شدن رطوبت اضافی دیسک‌های آنتی بیوتیک با فاصله مناسب بر روی پلیت قرار داده شده و به مدت 18 ساعت گرماخانه گذاری انجام گردید. پس از مدت فوق قطر هاله‌ها اندازه‌گیری و مقاومت یا حساسیت بر اساس قطر هاله تعیین گردید (مایتی و همکاران 2007).

نتایج

آزمون کاتالاز

باکتری‌های انتروکوکوس کاتالاز منفی هستند، البته گونه‌هایی از انتروکوکوس شبه کاتالاز هستند و برخی از سویه‌ها به میزان خفیفی فعالیت کاتالازی نشان می دهند (هیوکی 1998). نتیجه این آزمون نشان داد که از مجموع 20 سویه انتروکوکوس جداسازی شده، 19 سویه کاتالاز منفی و یک سویه کاتالاز مثبت بود.

¹ Mueller-Hinton

جدول 1- نتیجه آزمون تخمیر قند برای پنیر شماره 1

نتیجه تعیین هویت	آرایینوز	ملی بیوز	رافینوز	سوربوز	سوریتول	لاکتوز
<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	+	+
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	+	+
<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	+	+
<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	+	+
<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	+	+

جدول 2 - نتیجه آزمون تخمیر قند برای پنیر شماره 2

نتیجه تعیین هویت	آرایینوز	ملی بیوز	رافینوز	سوربوز	سوریتول	لاکتوز
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-	+
<i>E. faecium</i>	+	-	-	-	-	+
<i>E. faecium</i>	+	-	-	-	-	+
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	+	+
<i>E. faecium</i>	+	-	-	-	-	+

جدول 3 - نتیجه آزمون تخمیر قند برای پنیر شماره 3

نتیجه تعیین هویت	آرایینوز	ملی بیوز	رافینوز	سوربوز	سوریتول	لاکتوز
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	+	+
<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	+	+
<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	+	+
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+	+
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	+	+

آزمون تشکیل لخته

نورفلوکساسین و نیتروفوران‌توئین حساس بودند. 9 سویه انتروکوکوس به آنتی بیوتیک اریترومايسين و چهار سویه از نمونه پنیر سوم به آنتی بیوتیک تتراسایکلین مقاومت نشان دادند. همچنین برخی از سویه‌ها (7 سویه) به آنتی بیوتیک پنی سیلین مقاوم بودند. بعلاوه هیچ کدام از سویه‌ها به کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین، ریفامپسین و وانکومايسين مقاومت نشان ندادند (جدول 5).

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده شامل آموکسی-سیلین، نورفلوکساسین، وانکومايسين، اریترومايسين، تتراسایکلین، کلرامفنیکل، پنی سیلین، نیتروفوران‌توئین، ریفامپسین، سیپروفلوکساسین بودند (خلاصه نتایج آنتی بیوگرام باکتری‌های جداسازی شده در جدول 6 نشان داده شده است).

پس از تهیه محلول شیر خشک (10%)، سویه‌های انتروکوکوس فکالیس و فاسیوم به طور جداگانه در محلول فوق کشت داده شدند و به مدت 1 شبانه روز گرماخانه گذاری گردیدند. روز بعد مشاهده شد که سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم محلول را 2 فازه نموده و لخته تشکیل گردیده است. این موضوع نشان می‌دهد که سویه‌های تشکیل دهنده لخته، احتمالاً حاوی آنزیم‌های پروتئولیتیک بیشتری نسبت به سایر سویه‌ها هستند.

آزمون آنتی بیوگرام

نتایج آزمون آنتی بیوگرام نشان داد که تمامی سویه‌های انتروکوکوس جداسازی شده از چهار نوع پنیر لیقوان به آنتی بیوتیک‌های آموکسی سیلین،

جدول 4 - نتیجه آزمون تخمیر قند برای پنیر شماره 4

	لاکتوز	سوربیتول	سوربوز	رافینوز	ملی بیوز	آرابینوز	نتیجه تعیین هویت
سویه 1	+	-	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
سویه 2	+	-	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
سویه 3	+	-	-	-	-	+	<i>E. faecium</i>
سویه 4	+	-	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
سویه 5	+	-	-	-	-	+	<i>E. faecium</i>

جدول ۵ - نتیجه آزمون آنتی بیوگرام برای ۲۰ جداسازی شده از چهار نمونه پنیر لیقوان

دیسک های آنتی بیوتیک	P	AM	E	VA	Tet	C	CP	NX	FM	RP
سویه 1	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I
سویه 2	R	S	I	I	S	I	I	S	S	S
سویه 3	S	S	I	S	S	I	I	S	S	I
سویه 4	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
سویه 5	S	S	I	I	S	S	I	S	S	S
سویه 1	S	S	I	S	S	S	I	S	S	I
سویه 2	S	S	R	S	S	I	I	S	S	S
سویه 3	S	S	R	S	I	S	I	S	S	I
سویه 4	S	S	R	S	I	S	I	S	S	S
سویه 5	R	S	R	S	I	I	I	S	S	I
سویه 1	S	S	I	S	S	I	I	S	S	I
سویه 2	S	S	I	S	R	S	I	S	S	S
سویه 3	R	S	I	I	R	S	I	S	S	S
سویه 4	S	S	I	S	R	S	S	S	S	S
سویه 5	R	S	I	I	R	I	I	S	S	S
سویه 1	R	S	R	I	S	S	I	S	S	I
سویه 2	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
سویه 3	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
سویه 4	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
سویه 5	S	S	R	S	S	I	I	S	S	S

S= Sensitive, R= Resistant, I= Intermidate

دیسک های آنتی بیوتیک مورد استفاده شامل:

AM: آموکسی سیلین، NX: نورفلوکساسین، VA: وانکومایسین، E: اریترومایسین، Tet: تتراسایکلین، C: کلرامفنیکل، P: پنی سیلین، FM: نیتروفورانئوئین، RP: ریفامپسین، CP: سیپروفلوکساسین بودند.

جدول ۶- تعیین حساسیت یا عدم حساسیت سویه های انتروکوکوس به انواع آنتی بیوتیک بر حسب قطر هاله

آنتی بیوتیک	متوسط	مقاوم	حساس
Penicillin	≤ 14	-	≥ 15
Ampicillin	≤ 16	-	≥ 17
Vancomycin	≤ 14	15-16	≥ 17
Eritomycin	≤ 13	14-22	≥ 23
Tetracyclin	<14	15-18	>15
Ciprofloxacin	<15	16-20	>21
Nitrofurantoin	<14	15-18	>17
Rifampicin	<16	17-19	>20
Chloramphenicol	<12	13-17	>18
Norfloxacin	<12	13-16	>17

بحث

که شیر یک منبع مطلوب و ایده آل برای رشد این ارگانیزم‌ها شناخته شده است. انتروکوکوس‌ها به طور قابل توجهی می‌توانند در لخته پنیر و پنیرهای رسیده نیز حضور داشته باشند. بسیاری از تحقیقات، وجود انتروکوکوس را در شیر پاستوریزه و فرما^۱ و بقای آنها را در طی پروسه شیر تایید کرده اند (گاردینی و همکاران 2001).

مشخص شده است که حضور انتروکوکوس برای تکوین آرومای پنیر در بسیاری از کشورهای جنوبی اروپا ضروری می‌باشد. بسیاری از تحقیقات نشان داده است سویه‌های انتروکوکوس با منشا غذایی تاثیر مثبت روی رسیدگی پنیرهای سنتی دارند. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در پنیرهای سنتی ليقوان انتروکوکوس‌ها در مقادیر بالایی حضور دارند و از میان گونه‌های مختلف، گونه‌های انتروکوکوس فکالیس و فاسیوم، انتروکوکوس‌های غالب موجود در پنیر ليقوان را تشکیل می‌دهند. این نتایج با نتایج مطالعات ارائه شده از کشورهای مختلف هم خوانی دارد. اوگیر و سرور (2007) نشان دادند که در پنیرهای مدیترانه‌ای تعداد انتروکوکوس در لخته 10^4 - 10^6 CFU/g و در پنیر رسیده 10^5 - 10^7 CFU/g بود. همچنین هدف از انجام آزمون آنتی بیوگرام در مطالعه حاضر این بود که وضعیت مقاومت باکتری‌های انتروکوکوس را به انواع آنتی بیوتیک‌ها تعیین نماییم.

در تحقیقی که توسط نوید قاسمی (1383) انجام شد مشخص شد که انتروکوکوس‌ها جمعیت غالب میکروبی شیر خام را به خود اختصاص داده‌اند. بنابراین، با احتمال زیاد تاثیر قابل توجهی روی خواص کیفی و ارگانولپتیکی پنیر حاصل از آن داشته‌اند. در ترکیب پنیر سه ماهه ليقوان، انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس وجود دارند که با توجه به خواص پروتئولیتیک و لیپولیتیک، می‌توانند تاثیر ویژه‌ای روی خواص کیفی پنیر ليقوان بر جای

از چندی قبل با توجه به ارزش تغذیه‌ای بالای پنیر، مطالعات گسترده‌ای برای بهبود خواص کمی و کیفی این محصول انجام شده است، تا جایی که برای ارتقای سطح کیفی این فرآورده و تولید محصولات بازار پسندتر، توجه ویژه‌ای روی پنیرهای سنتی و محلی موجود در سراسر دنیا معطوف گردیده است. در ایران نیز عمده‌ترین و مشهورترین پنیر سنتی، پنیر ليقوان تبریز است که به علت عطر و طعم مطلوب خود، بازار پسندی بالایی را در کشور دارا است. مدت زمان تولید این پنیر از زمان شروع شیر دوشی گوسفندها (یعنی اواخر زمستان) تا اواخر شهریور می‌باشد. این پنیر جزء پنیرهای نیمه سفت است که دوره رسانیدن آن در محلول آب نمک 11 الی 12 درصد به مدت سه ماه صورت می‌گیرد و برای تهیه آن از شیر خام گوسفند استفاده می‌شود. در تهیه آن هیچ نوع کشت آغازگری به شیر اولیه افزوده نمی‌شود و فلور میکروبی طبیعی موجود در شیر خام است که در کنار پروتئازهای طبیعی شیر و رنت افزوده شده باعث تولید عطر و طعم خاص و مطلوب پنیر رسیده می‌گردد (نوید قاسمی 1383).

عوامل متعددی بر روی خواص ارگانولپتیک پنیر موثر هستند که از مهمترین آنها می‌توان به نوع شیر، کیفیت میکروبی آن، تکنولوژی مورد استفاده در تولید پنیر و شرایط رسیدن پنیر اشاره کرد. در عین حال، باکتری‌های لاکتیک نقش عمده و مهمی را در ایجاد ترکیبات مسئول بهبود عطر و طعم در پنیر بر عهده دارند، به طور کلی انتروکوکوس‌ها هم به عنوان آلوده کننده محیط و هم در نقش استارتر طبیعی که باعث تکوین خصوصیات ارگانولپتیکی پنیرهای کامل می‌شوند، مطرح هستند (ساران تینی پولوس و همکاران، 2002). انتروکوکوس عموماً در شیر خام و محصولات لبنی حضور دارد، چرا

¹ UHT

توانایی آنها در تولید باکتریوسین‌ها (انتروسین) عامل مهمی است که باید برای کاربرد آنها در تهیه مواد غذایی توسط فرآوری کننده‌ها مورد توجه قرار گیرد (فولکوی مورنو و همکاران ۲۰۰۶). این موضوع که حضور انتروکوکوس در پنیرهای رسیده منجر به توسعه آروما می‌شود یا نه، هنوز بحث برانگیز است. بعضی از محققان بر این باور هستند که مقادیر زیاد انتروکوکوس منجر به گندیدگی و ویژگی‌های نامطلوب در بعضی از پنیرها می‌شود. از طرف دیگر بسیاری از گزارش‌های دیگر اشاره به تاثیر مطلوب انتروکوکوس در تولید و کیفیت پنیر دارند (ساران تینی پولوس و همکاران ۲۰۰۲). بعلاوه تفاوت در برخی ویژگی‌های تکنولوژیکی (به ویژه فعالیت پروتئولیتیکی) می‌تواند منجر به انتخاب سویه‌های ویژه شود و بنابراین در کنار باکتری‌های لاکتیک اسید به عنوان استارتر در تولید پنیرهای سنتی مورد استفاده قرار گیرد. عدم وجود عوامل بیماری‌زایی و واگیر در سویه‌های وحشی انتروکوکوس فاسیوم نشان می‌دهد که آنها می‌توانند به عنوان استارترهای غیر سنتی برای ایجاد ویژگی‌های حسی و تضمین سلامت این پنیرها به کار برده شوند (ساودرا و همکاران ۲۰۰۳)

بگذارند (نوید قاسمی زاد ۱۳۸۳). همچنین ساران تینی پولوس و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که در پنیرهایی نظیر: سبریرو^۱، سرا^۲، تلیمه^۳، فتا^۴، کمته^۵، منچگو^۶، موزارلا^۷ و کفالوتریک^۸، انتروکوکوس‌ها قسمت اعظم فلور میکروبی پنیر تازه دلمه شده را به خود اختصاص می‌دهد و در بعضی از موارد، میکروارگانیزم‌های برجسته و غالب در محصولات رسیده را شامل می‌شوند.

انتروکوکوس به عنوان بخش مهمی از میکروفلور طبیعی بسیاری از فرآورده‌های لبنی تشخیص داده شده و در بعضی از پنیرها، آنها بر فلور لاکتوباسیل و لاکتوکوکسی غالب هستند (سوزی و همکاران ۲۰۰۰). نتایج بعضی از تحقیقات نشان می‌دهد که میکروارگانیزم غالب در پنیر سبریرو، انتروکوکوس فکالیس است که فراوان‌ترین انتروکوکوس جداسازی شده از پنیر تازه ایتالیایی تهیه شده از شیر خام اسیدی است. این میکروارگانیزم در مراحل مختلف برای تسریع رسیدن و بهبود خصوصیات ارگانولپتیکی پنیرها و سایر محصولات تخمیری شیر استفاده می‌شود (سنتتو و همکاران ۱۹۹۹). در پنیر منچگو پنیر تهیه شده از شیر خام گوسفند، لاکتوکوکوس لاکتیس فلور غالب بوده و سپس انتروکوکوس، لویکونستوک، استریپتوکوکسی و میکروکوکسی فلور اعظم این پنیر را تشکیل می‌دهند (دال و همکاران ۲۰۰۰).

در مجموع می‌توان اظهار داشت که حضور انتروکوکوس در مقادیر بالا در پنیرهای مختلف، با کمک به بهبود ویژگی‌های ارگانولپتیکی مواد غذایی تخمیری و

¹ Cebreiro

² Serra

³ Teleme

⁴ Feta

⁵ Comte

⁶ Manchego

⁷ Mozzarella

⁸ Kefalotyric

منابع مورد استفاده

نوید قاسمی زاد س، ۱۳۸۳. شناسایی باکتری‌های لاکتیک در پنیر سنتی لیقوان. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

Centeno JA, Menendez S, Hermida MA and Rodriguez-Otero JL, 1999. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. International Journal of Food Microbiology 48: 97-111.

Dahl S, Freni K, Tavaría F and Malcata X, 2000. Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. International Dairy Journal 10: 255-262.

Foulquie Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E and De Vuyst L, 2006. The role and application of enterococci in food and health. International Journal of Food Microbiology 106: 1-24.

Fox PF, Guinee TP and McSweeney PLH, 2000. Fundamental of cheese science. Gaithersburg: Aspen Publisher, Inc.

Gardini F, Martuscelli M, Carmela Caruso M, Galgano F, Crudele MA., Favati F, Guerzoni ME and Suzzi G, 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. International Journal of Food Microbiology 64: 105-117.

Giraffa G, 2002. Enterococci from foods. FEMS Microbiology Reviews 26: 163-171.

Girrafa G, 2003. Functionality of enterococci in dairy products. International Journal of Food Microbiology 88: 215-222.

Hardie JM and Whiley RA, 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement 83: 1S-11S.

Huycke M, 1998. Multiple-drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. Emerging Infections Diseases 4: 239-249.

Lee WSh, 1972. Improved procedure for identification of group D Enterococci with two new media. Applied Microbiology 24: 1-3.

Lopez-Diaz TM, Alonso C, Roman C, Garcia-Lopez ML and Moreno B, 2000. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. Food Microbiology 17: 23-32.

Maietti L, Bonvini B, Huys G and Giraffa G, 2007. Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants among *Enterococcus italicus* isolates from dairy products. Systematic and Applied Microbiology 30: 509-517.

- Morandi S, Brasca M, Andrighetto C, Lombardi A and Lodi R, 2006. Technological and molecular characterization of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *International Dairy Journal* 16: 867-875.
- Ogier JC and Serror P, 2007. Part VI: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 2: 1-11.
- Psoni L, Tzanetakis N and Litopoulou-Tzanetaki E, 2003. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. *Food Microbiology* 20: 575-582.
- Saavedra L, Taranto MP, Sesma F and Valdez GF, 2003. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International Journal of Food Microbiology* 88: 241-245.
- Sarantinopoulos P, Andrighetto C, Georgalaki MD, Rea MC, Lombardi A, Cogan TM, Kalantzopoulos G and Tsakalidou E, 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal* 11: 621-647.
- Sarantinopoulos P, Leroy F, Leontopoulou E, Georgalaki MD, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E and De Vuyst L, 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *International Journal of Food Microbiology* 72: 125-136.
- Suzzi G, Caruso M, Gardini F, Lombardi A, Vannini L, Guerzoni ME, Andrighetto C and Lanorte MT, 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (Semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology* 89: 267-274 .