

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

محمد رضا عدالتیان^{۱*} - محمد باقر حبیبی نجفی^۲ - سید علی مرتضوی^۳ - سید مجید هاشمی^۴ - مسعود یاورمنش^۵

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 لوبیکونوستوک 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 جنس‌ها در نمونه‌های پنیر تازه و رسیده (۹۰ روزه) تایید گردیدند. در مرحله بعد برای شناسایی جدایه‌های مذکور تا مرحله گونه، از تخمیر کربوهیدرات‌ها با استفاده از کیت‌های API 20 STREP و API 50 CH استفاده گردید. در نهایت جنس و گونه‌های *Lactobacillus plantarum*، *Lb. brevis*، *Lb. lindneri*، *Lb. helveticus*، *Lb. pentosus*، *Ent. faecium*، *Enterococcus faecium*، *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*، *Lb. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*، *Lb. fermentum*، *Ent. durans*، *Ent. avium*، *faecalis*، *Aerococcus viridans* 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 و فلور غالب را تشکیل می‌دادند. گونه‌های غالب به ترتیب فراوانی در پنیر تازه 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 گونه‌ها 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 گونه‌ها تا مراحل زیرگونه و سویه 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

ویژگی‌های ارگانولپتیک مطلوب شده و از رشد پاتوژن‌ها جلوگیری کرده و در نتیجه 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 مقادیر متنابهی یافت می‌شوند و ممکن است از طریق فعالیت‌های بیوشیمیایی، نقش مهمی در رسیدن ایفا نمایند (Durlu-Ozkaya et al., 2001). بدست آوردن اطلاعات در مورد ترکیب میکروفلورلاکتیکی طبیعی پنیرهای سنتی، می‌تواند در تعیین آغازگری سهیم باشد که به استاندارد شدن کیفیت و ایمنی محصول در مقیاس صنعتی بدون تغییر در خواص بنیادی آن، کمک می‌نماید.

باکتری‌های اسیدلاکتیک، یک گروه هتروژن (نامتجانس) از ارگانوسیم‌های گرم مثبت، غیراسپورزا را تشکیل می‌دهند که در اثر تخمیر قند، تولید اسیدلاکتیک می‌نمایند. توانایی این باکتری‌ها در کاهش pH بوسیله تولید اسید از قند، منجر به توسعه و پیشرفت

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵- به ترتیب استادیار، استادان، دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(Email: edalatian@um.ac.ir)
* - نویسنده مسئول:

هدف از انجام این پژوهش، جداسازی و شناسایی فلور لاکتیکی پنیر کوزه در دو مرحله پنیر تازه و پنیر رسیده، با استفاده از محیط کشت‌های مختلف بود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه برداری در فصل تابستان و از دو مرحله پنیر تازه (یک روزه) و پنیر رسیده (سه ماه رسیدگی) از ده مرکز تولید کننده پنیر کوزه از ارومیه صورت گرفت. سپس نمونه‌ها 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 مورد استفاده قرار می‌گیرد. فرآیند تولید این پنیر در شکل ۱، قابل مشاهده است.

آماده سازی نمونه‌های پنیر برای جداسازی فلور لاکتیکی از آن

ابتدا ۲۵ گرم از پنیر تازه و رسیده به ۲۲۵ سی سی محلول سترات سدیم ۲٪ وزنی - حجمی استریل اضافه شد، مخلوط حاصل به داخل کیسه استریل مخصوص دستگاه استومر (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 ۱۰^{-۲} تا ۱۰^{-۷} از آب پیتونه استریل ۰/۱ درصد 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^۲ برای انتروکوکوس ها (Navidghasemzad et al., 2009) منتقل شد (هر کشت در دو تکرار انجام پذیرفت). لازم به ذکر است که برای هر محیط کشت از رقت‌های مورد نظر یک کشت آمیخته^۳ نیز صورت گرفت. سپس محیط‌های کشت تلقیح شده داخل جاربوی هوازی مرک به همراه گاز پک مدل A در سه دمای ۳۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتیگراد جهت رشد باکتری‌های مزوفیل و ترموفیل قرار گرفت. لازم به توضیح است که برای باکتری‌های انتروکوکوس در محیط کشت KAA فقط از شرایط هوازی استفاده گردید. مدت زمان گرمخانه گذاری بسته به نوع باکتری بین ۲۴ تا ۴۸ ساعت و حداکثر ۷۲ ساعت در نظر گرفته شد.

پنیرهای حاصل از شیرخام، معمولاً 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 معمولاً بدون افزودن کشت آغازگر تولید می‌شوند. بنابراین فرایندهای تخمیر و رسیدگی این فرآورده، کاملاً توسط فلور میکروبی 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 فرآورده‌های گوشتی و سیلاژ علفه از دیرباز، استفاده شده‌اند. هزاران نژاد و سویه از مواد غذایی مختلف جداسازی شده‌اند و صدها نژاد انتخاب شده نیز به عنوان کشت‌های آغازگر در تخمیرهای غذایی صنعتی به کاررفته‌اند. اکثر گونه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک نقش مهمی را در رسیدن پنیرها، ایفا می‌نمایند (Gurses and Erdogan, 2006).

در بین پنیرهای سنتی حاصل از شیرخام ایرانی، پنیر کوزه، بی شک یکی از مهم 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 و واحدی اسیدی و شور مزه است که حالت گرانولی داشته و ظاهری خشک دارد. تولید آن بصورت کاملاً 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).

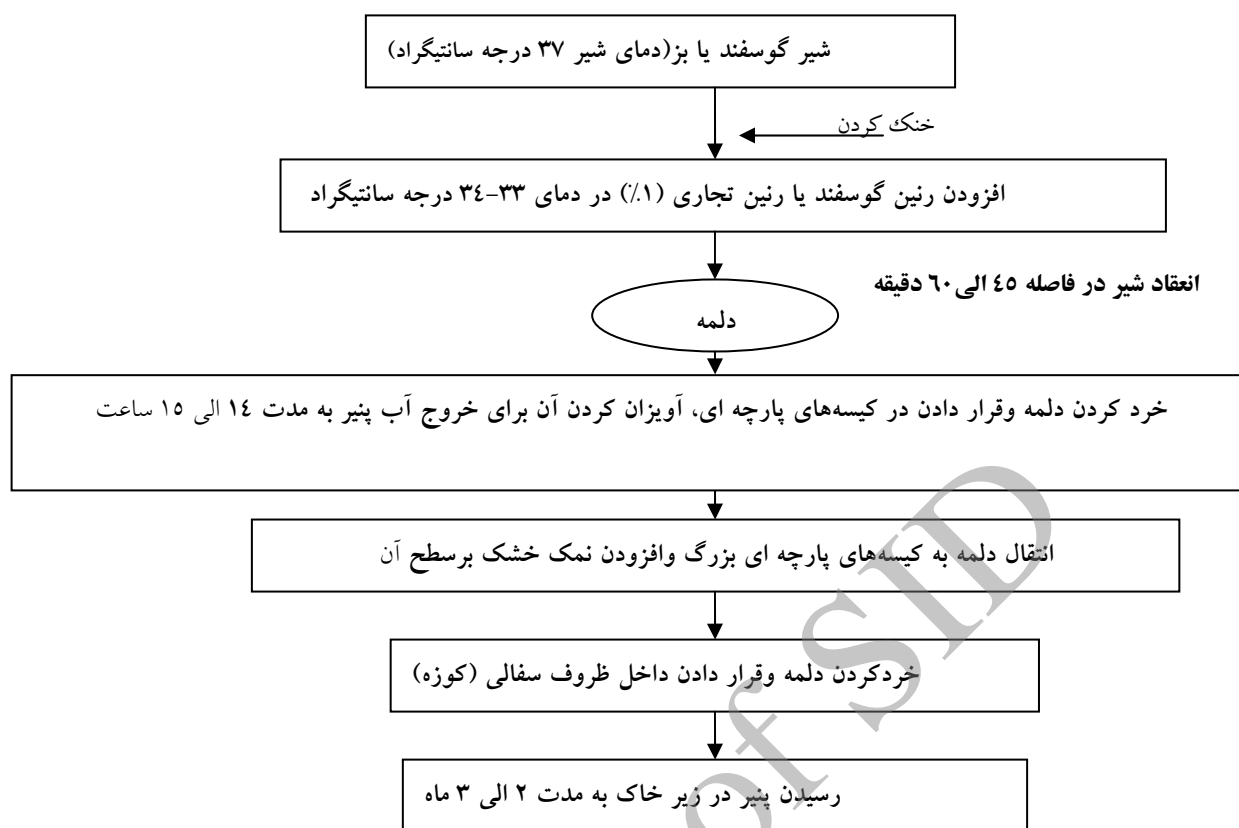
اکوسیستم میکروبی ذاتی در پنیرهای سنتی حاصل از شیرخام، به عنوان مهم ترین فاکتور مرتبط با منحصر به فرد بودن (این قبیل فرآورده‌ها) در نظر گرفته می‌شود. به این دلیل، مطالعه جوامع میکروبی، می‌تواند در انتخاب نژادهای جدید به منظور استفاده برای تولید پنیرهای سنتی در مقیاس زیاده یا برای بهبود تولید فرآورده لبنی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

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

2- Kanamycin Aesculin Azid Agar

3- Pour Plate

1- Typicity



شکل ۱- نمودار فرایند تولید پنیر کوزه.

گلوکزدر MRS مایع در لوله دورهام جهت تشخیص هومو یا هتروفرمانتاتیو بودن، تجزیه سیترات در محیط سیمون سیترات آگار و آزمون وگوس-پروسکوئر در محیط MR-VP به عنوان تست‌های تأییدی صورت گرفتند (Edalatian et al., 2012).

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

کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، هوموفرمانتاتیو قادر به رشد در دمای ۱۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد و نیز قادر به رشد در غلظت ۶/۵ درصد نمک و $pH=9/6$ به عنوان جنس انتروکوکوس در نظر گرفته شدند (Edalatian et al., 2012; Navidghasemizad et al., 2009).

کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی هوموفرمانتاتیو با آرایش سلولی تتراد به عنوان پدیوکوکوس و کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز

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 و سپس 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 در هر پلیت مورد آزمونهای رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، مورفولوژی در زیر میکروسکوپ قرار گرفتند. در نهایت، 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 از همه نمونه‌ها (پنیر تازه و پنیر رسیده) جدا گردید و مورد آزمون‌های بیوشیمیایی و تست‌های تأییدی قرار گرفتند.

آزمونهای بیوشیمیایی و تست‌های تأییدی

تست رشد در دمای ۱۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد، رشد در غلظت نمک ۶/۵٪، رشد در $pH=9/6$ ، تست هیدرولیز آرژنین به کمک معرف نسلر، هیدرولیز اسکولین، تولید گاز دی اکسید کربن از قند

(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 باکتری‌ها بوده است. اما از طرف دیگر حضور سایر باکتری‌ها مانند کوکسی شکل‌ها را در این محیط کشت می‌توان این گونه توجیه نمود که انتخاب پذیری پایین این محیط، اجازه رشد باکتریهای سایر جنس‌ها را می‌دهد (Caridi, 2003). در خصوص محیط M17، علیرغم انتخاب پذیری بالای این محیط برای جنس لاکتوکوکوس (Fox *et al.*, 2000)، بیش از نیمی از باکتری‌های جدا شده از این محیط کشت متعلق به جنس انتروکوکوس بودند (۱۲ از ۱۹) (جدول ۱). 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 $\log \text{ cfu/ml(g)}$ در محیط‌های کشت مختلف مورد استفاده برای باکتریهای اسیدلاکتیک در سه دمای ۳۷، ۳۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد در دو مرحله پنی‌تازه (یک روزه) و رسیده (۹۰ روزه) در جدول ۲ ارائه شده است. در محیط MRS در هر سه دما، یک روند کاهشی پنی‌تازه نسبت به پنی‌رسیده مشاهده شد که معنی دار نبود ($P < 0.05$). این روند کاهشی از مرحله پنی‌تازه به پنی‌رسیده در مورد پنی‌لیقوان در تحقیقات نوید قاسمی زاد و همکاران (۲۰۰۹) مشاهده گردید. در دو محیط کشت M17 و KAA در هر سه دما، شاهد یک روند افزایشی اما به لحاظ آماری بی معنی می‌باشد ($P < 0.05$). این روند افزایشی از پنی‌تازه به رسیده کاملاً قابل انتظار و توجیه بوده، چراکه اولاً باتوجه به داده‌های جدول ۱، طیف غالب باکتری‌های جدا شده از این دو محیط کشت، باکتری‌های جنس انتروکوکوس بوده‌اند (جدول ۱)، ثانیاً براساس گزارش‌ها می‌توان روند افزایشی را در جنس انتروکوکوس از ابتدای دوره رسیدن تا انتهای آن مشاهده کرد، بطوری که در پنی‌های رسیده از این دست (پنی‌های حاصل از شیر خام) انتروکوکوس‌ها فلور غالب راتشکیل می‌دهند (Lopez- Diaz *et al.*, Gurses and Erdogan, 2005). در این میان، فقط در محیط MRS+Van و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد روند افزایشی معنی داری مشاهده گردید ($P < 0.05$). یکی از نکات قابل توجه در مورد باکتری‌های انتروکوکوس از این جهت است که رشد سایر باکتری‌های اسیدلاکتیک رابوسیله هیدرولیز کازئین‌ها به الیگوپپتیدها، تحریک می‌کنند (Ohta and Boubekri, 1996). دلیل ارتباط کاهش شمارش باکتری‌ها در محیط MRS با تحریک رشد باکتری‌های لاکتیکی توسط انتروکوکوس‌ها را می‌توان این گونه توجیه نمود که اولاً در محیط کشت‌های MRS اکثر کلنی‌های رشد کرده، متعلق به جنس لاکتوباسیلوس بودند.

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

برای باکتری‌های میله ای شکل گرم مثبت و کاتالازمنفی، رشد در دمای ۴۵ و ۱۵ درجه سانتیگراد و نیز تولید گاز CO_2 از گلوکز در لوله دوره‌ام صورت گرفت (Edalati *et al.*, 2012; Navidghasemizad *et al.*, 2009).

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

آنالیز آماری

پروفایل‌های بدست آمده توسط کیت‌های CH API 50 و API 20 STREP با کمک ضریب Simple Matching Coefficient با هم مقایسه و با آنالیز UPGMA^۱ و برنامه Statistical Package خوشه بندی^۲ شدند.

داده‌های حاصل از جمعیت ارگانسیم هابه صورت لگاریتمی ($\log \text{ cfu/g}$) 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 در سطح معنی دار ۹۵ درصد با حروف a, b, c, ... مشخص شدند.

نتایج و بحث

توزیع فراوانی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از محیط کشت‌های مختلف برای پنی‌کوزه (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 طور قابل ملاحظه ای در محیط MRS آگار غالب بوده اند (۸ از ۱۴) به طوری که بیش از نیمی از ایزوله‌ها بر روی این محیط کشت لاکتوباسیلوس بودند (۸ از ۱۴) و ما بقی باکتری‌های کوکسی شکل را شامل می‌شدند. بنابراین می‌توان گفت که این محیط برای باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس مناسب بوده است. نتایج مشابهی برای پنی‌ تولوم گزارش شده است

- 1- Unweighted pair groups average linkage analysis
- 2- Cluster

جدول ۱- توزیع باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از محیط کشت‌های مختلف در پنیر تازه ورسیده کوزه از تعداد ده نمونه

محیط کشت						
مجموع	KAA	M17	MRS+Vancomycin	MRS	جنس‌های باکتری	محصول
۳	۱	-	-	۲	لاکتوباسیلوس	پنیر تازه
۴	-	۳	-	۱	لاکتوکوکوس	
۱	۱	-	-	-	انتروکوکوس	
۱	-	-	-	۱	پدیوکوکوس	
-	-	-	-	-	اُتروکوکوس	
۱۳	-	۴	۳	۶	لاکتوباسیلوس	پنیر رسیده
۲	-	-	-	۲	لاکتوکوکوس	
۲۲	۸	۱۲	-	۲	انتروکوکوس	
-	-	-	-	-	پدیوکوکوس	
۲	۲	-	-	-	اُتروکوکوس	
۴۸	۱۲	۱۹	۳	۱۴	مجموع	

است (Lopez-Diaz *et al.*, 2000).

از داده‌ها و اطلاعات جدول ۳، به عنوان آزمون‌های تاییدی برای شناسایی ایزوله‌ها 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 نمی‌کردند، به عنوان جنس لاکتوکوکوس و آن دسته که رشد در دمای ۴۵ درجه و غلظت 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).

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 داشته‌اند، بنابراین تعداد انتروکوکوس‌ها 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 بوده‌اند، بر اساس جدول ۱) گردد. ثانیا، منظور از تحریک رشد باکتری‌های لاکتیکی که در اثر خاصیت پروتئولیتیکی انتروکوکوس‌ها، رخ می‌دهد، بیشتر تحریک باکتری‌های مولد گاز به تولید گاز بیشتر (مانند لویکونوستوک‌ها) و تولید اسید بیشتر توسط لاکتوکوکوس‌ها بوده

جدول ۲- تغییرات تعداد کلنی‌ها در محیط‌های کشت مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک در پنیر کوزه تازه ورسیده بر حسب log cfu/mL, log cfu/g میانگین و انحراف معیار آنها

پنیر رسیده	پنیر تازه	درجه حرارت اینکوباسیون	محیط کشت
۶/۷۴ ± ۰/۰۷ ^{abc}	۶/۸۷ ± ۰/۰۴ ^{abc*}	۳۰	MRS
۶/۸ ± ۰/۰۵ ^{abc}	۶/۹۳ ± ۰/۰۳ ^{abc}	۳۷	
۵/۵ ± ۰/۰۳ ^{cd}	۵/۹۲ ± ۰/۰۲ ^{cd}	۴۵	
۵/۶۵ ± ۰/۰۴ ^{cd}	۱ ^e	۳۰	MRS+ vancomycin
۱ ^e	۱ ^e	۳۷	
۱ ^e	۱ ^e	۴۵	
۶/۹ ± ۰/۰۶ ^{abc}	۶/۶۲ ± ۰/۰۳ ^{abcd}	۳۰	M17
۶/۶۲ ± ۰/۰۱۶ ^{abcd}	۶/۰۸ ± ۰/۰۱۲ ^{cd}	۳۷	
۷/۷۹ ± ۰/۰۳ ^a	۷/۶۱ ± ۰/۰۱ ^{ab}	۴۵	
۶/۰۳ ± ۰/۰۳ ^{cd}	۵/۱۵ ± ۰/۰۲ ^d	۳۰	KAA
۶/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{cd}	۵/۶۸ ± ۰/۰۱۲ ^{cd}	۳۷	
۶/۱۲ ± ۰/۰۲ ^{bcd}	۵/۹۲ ± ۰/۰۱ ^{cd}	۴۵	

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

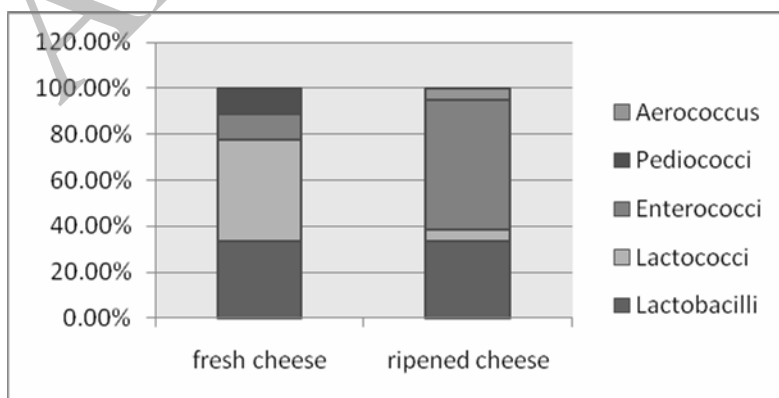
جدول ۳- خصوصیات بیوشیمیایی اسیدلاکتیک باکتری‌های جدا شده از پنیر کوزه تازه و رسیده

مصرف سبترات	هیدرولیز آرژنین	تست VP	تولید گاز از گلوکز	رشد در pH 9.6	رشد در ۶/۵٪ نمک	رشد در C ۴۵°	رشد در C ۱۵°	خواص بیوشیمیایی	نژادها
-	+	+	-	-	-	-	+	<i>Lac.lactis ssp. lactis</i>	
-	-	-	-	+	+/-	-	+	<i>Lb.plantarum</i>	
-	+	-	+	+/-	-	-	+	<i>Lb.brevis</i>	
nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	<i>Lb. lindneri</i>	
nd	-	nd	-	nd	nd	+	-	<i>Lb.helveticus</i>	
-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Lb. delbrueckii ssp. delbrueckii</i>	
nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	+	<i>Lb.pentosus</i>	
nd	+	nd	+	nd	nd	+	-	<i>Lb.fermentum</i>	
-	+	+	-	-	+	-	+	<i>Pediococcus sp.</i>	
-	+	+	-	+	+	+	+	<i>Ent. faecium</i>	
-	+	+	-	+	+	+	+	<i>Ent.faecalis</i>	
nd	-	+	-	+	+	+	+	<i>Ent.avium</i>	
-	+	+	-	+	+	+	+	<i>Ent.durans</i>	
nd	nd	nd	-	+	+	-	+	<i>Aerococcus viridans</i>	

nd: تعیین نشده

شرکت می‌کنند (Gurses and Erdogan, 2005). توزیع باکتری‌های اسیدلاکتیک در پنیر تازه و رسیده کوزه، در جدول ۴، 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) و *Lb. brevis* (۲۲/۲۲ درصد) به ترتیب بالاترین فراوانی را نشان 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.

شکل ۱، روند تغییرات (فراوانی سویه‌های جدا شده) هر یک از جنس‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک را در مراحل پنیر تازه و رسیده نشان می‌دهد. همانطور که ملاحظه می‌شود در پنیر تازه، جنس لاکتوکوکوس فلور غالب را تشکیل می‌دهد. در پنیر رسیده لاکتوکوسی‌ها توسط باکتری‌های جنس انتروکوکوس جایگزین می‌شوند. این الگو ورود در اکثر پنیرهای سنتی و حاصل از شیر خام مشاهده شده است و منطقی به نظر می‌رسد (Lopez- Diaz et al., 2000؛ Navidghasemizad et al., 2009؛ and Erdogan؛ Gurses, 2005). چراکه لاکتوکوکوس‌ها در آغاز فرایند طیف غالب فلورلاکتیکی را تشکیل می‌دهند که مسئول اسیدیفیکاسیون شیر بوده و منجر به تولید دلمه می‌شوند و پس از آن فلورلاکتیکی تغییر می‌یابد و انتروکوکوس‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها غالب شده و در فرایند رسیدن



شکل ۱- تغییرات جنس‌های مختلف اسید لاکتیک باکتری‌ها (بر حسب درصد یا تعداد سویه‌های جدا شده از ده نمونه محصول) در پنیر کوزه تازه و رسیده

جدول ۴- توزیع باکتری‌های اسیدلاکتیک در پنیر کوزه تازه و رسیده بر اساس خصوصیات فنوتیپیک (API 50 CH, API 20 STREP)

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

*- اعداد داخل پرانتز نشان دهنده درصد باکتری‌ها هستند.

لاکتوکوکسی‌ها، لاکتوباسیلوس‌های هتروفرمنتاتیو اختیاری^۱، که همواره در ارتباط با انتروکوکوس‌ها هستند، گروه‌های میکروبی عمده‌ای هستند که در این گونه پنیرها حضور دارند (Comunian et al., 2010).

پروفایل تخمیر کربوهیدرات

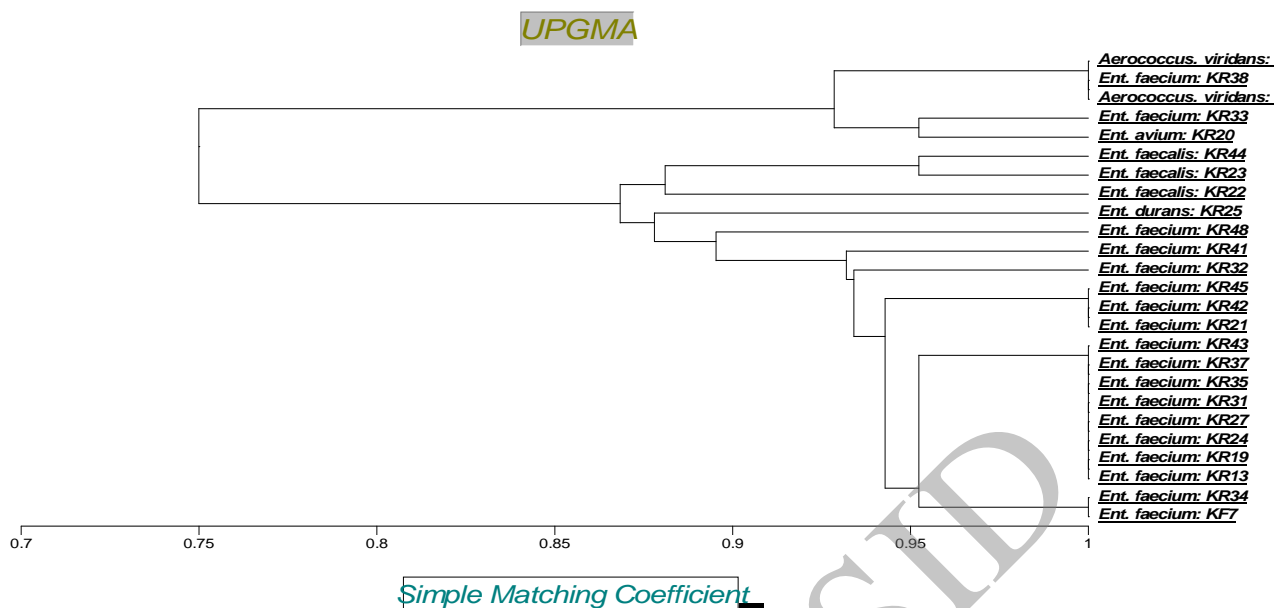
در مجموع، ۱۳ پروفایل متفاوت تخمیر کربوهیدرات با استفاده از کیت‌های API 20 TREP مشاهده شد (شکل ۲). براساس نتایج آنالیز آماری و دندوگرام حاصل از آنالیز UPGMA، درجه بالایی از مشابهت دیده شد. (با استفاده از ضریب هم‌هنگ کننده ساده^۲).

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 از ضریب هم‌هنگ کننده ساده).

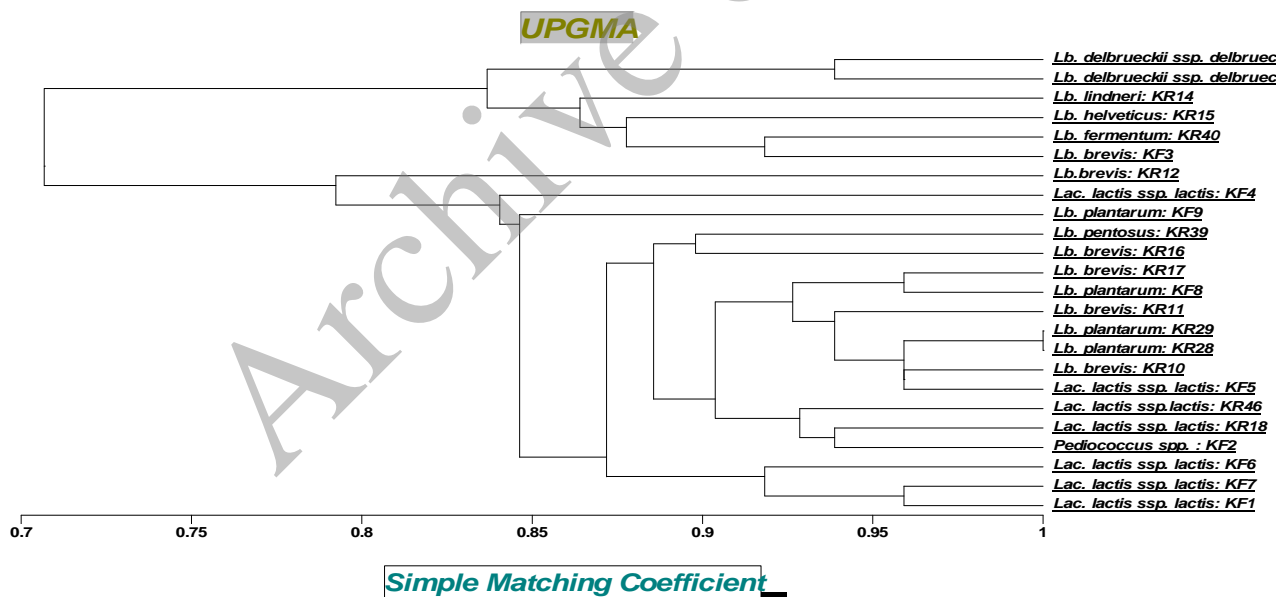
روند مشابهی در انتروکوکوس‌های پنیرهای تولوم و پنیرتولوم کپکی آبی تولید شده با *Penicillium roqueforti* مشاهده شده است (Erdogan and Gurses ; Gurses and Erdogan, 2005) ، (2006).

پس از جنس انتروکوکوس در پنیررسیده، بالاترین فراوانی متعلق به جنس لاکتوباسیلوس (۳۳/۳۳ درصد) گونه‌های *brevis* (۱۲/۸۲ درصد) و *plantarum* (۵/۱۲ درصد) می‌باشد. حضور سایر گونه‌های جنس لاکتوباسیلوس هرچند با فراوانی کمتر قابل توجه است. به عنوان مثال، حضور برخی لاکتوباسیلوس‌های هتروفرمنتاتیو مانند *Lb. brevis* و *Lb. fermentum* در این پنیری می‌باشد که در سایر پنیرها 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 و روند تغییرات گونه‌های شناسایی شده در دو پنیر تازه و رسیده مشابه روند حاصل از جداول قبلی بوده و تأییدی بر نتایج بدست آمده می‌باشد. در اکثر مطالعات اشاره شده است که

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



شکل ۲- دندوگرام پروفایل تخمیر کربوهیدرات که توسط سیستم API 20 STREP بدست آمده است. ماتریس مشابهت پروفایل ها ، بوسیله روش UPGMA Clustering مورد آنالیز کلاستر قرار گرفت. کدها : KR(Koozeh Ripened),KF(Koozeh Fresh). خطوط عمودی دندوگرام نشان دهنده میزان شباهتی است که گروه‌های متصل شده به هم بوسیله این خطوط دارند.



شکل ۳- 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

شناسایی دقیق تر این گونه ها در سطح زیرگونه معطوف گردد. جهت دستیابی به این هدف، تکنیک های دقیق تری مانند روش های مولکولی مورد نیاز است.

در بین گونه های باکتری های اسیدلاکتیک پیداشده در نمونه های مورد آزمایش، که جنس های متعلق به انتروکوکوس، لاکتوباسیلوس و لاکتوکوکوس، جمعیت اصلی لاکتیکی در پنیر کوزه تازه ورسیده را تشکیل می دادند. انتروکوکوس ها، به ویژه در پنیر رسیده فلور غالب بودند. بطوریکه انتروکوکوس ها روند افزایشی و لاکتوکوکوس ها روند نزولی را در انتهای رسیدن نشان دادند. همچنین گونه های *Lac. Ent. faecium*، *Ent. faecalis*، *lactis* ssp. *lactis* و *Lb. brevis* و *Lb. plantarum* نسبت به سایر گونه ها، در تعداد بالاتری شناسایی شدند. این حقیقت بر این امر دلالت دارد که این گونه ها می توانند نقش مهمی در تولید و رسیدگی پنیر بازی کنند. به منظور کاربرد این نژادها در مقیاس صنعتی، باید توجه بیشتری به

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله، از شرکت محترم صنایع لبنی رضوی جهت حمایت مالی این پروژه کمال تشکر و سپاسگزاری را دارد. همچنین از همکاری جناب آقای مهندس حسامی راد، عضو هیات علمی مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان آذربایجان غربی در خصوص کمک در جمع آوری نمونه های پنیر کوزه در مراحل مختلف و نیز از استاد محترم جناب آقای دکتر خمیری جهت ارسال و در اختیار قرار دادن برخی ایزوله های باکتری های اسید لاکتیک، قدردانی می گردد.

منابع

- موسوی پور، ف.، برازجانی، م. و حسامی راد، ر.، ۱۳۸۸، بررسی تاثیر منطقه تولید و زمان نگهداری بر تغییرات ماده خشک، چربی و اسیدهای چرب پنیر کوزه ای آذربایجان غربی. مجله پژوهش های 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., Ghodduzi, 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.