

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک پنیر سنتی ليقوان

سیدمحمد احمدی^۱، *مرتضی خمیری^۲، اصغر خسروشاهی^۳ و مهدی کاشانی‌نژاد^۴

^۱دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ^۲دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ^۳دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/۱۴

چکیده

هدف از این مطالعه، شناسایی فلور لاکتیکی پنیر ليقوان بود، که اولین مرحله به سوی توسعه استارت‌تری است که تولید محصولی سالم و با بافت یکنواخت را از شیر پاستوریزه اجازه خواهد داد. ۵۴ کلنی باکتری اسید لاکتیک از ۴۸۰ کلنی ایزوله شده از نمونه‌های پنیر ليقوان انتخاب و سپس ایزوله‌ها براساس آزمایش‌های بیوشیمیایی شناسایی گردیدند. در ۶ جنس *Lactobacillus*، *Enterococcus*، *Sterptococcus*، *Pediococcus*، *Leuconostoc* و *Lactococcus* دسته‌بندی شدند (به‌ترتیب ۵۵/۵، ۱۱/۱۱، ۹/۲۵، ۵/۵۵، ۳/۷۰ و ۱/۸۵ درصد و ۱۲ درصد ایزوله‌ها شناسایی نشدند). *L. agilis* (۱۳ ایزوله)، *L. plantarum* (۸ ایزوله)، گروه *Enterococcus faecium* (۵ ایزوله)، گونه‌های غالب در محصول بودند. سایر گونه‌های *Lactobacillus* شناسایی شده شامل *L. maltaromicus*، *L. paracasiae* subsp *paracasiae*، *L. salvarius*، *L. intstinalis*، *L. acetotolerance* (به‌ترتیب ۴، ۲، ۱، ۱ و ۱ ایزوله) بودند. همچنین ایزوله‌هایی از *Leu. mesenteroides* subsp *dextranicum*، *Enterococcus faecalis*، *S. oralis*، *S. downei*، *S. thermophilus*، *P. pentosaceus* subsp *intermedius*، *P. inopinatus*، *Leu. mesenteroides* subsp *mesenteroids* شناسایی شدند. براساس نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌شود که یک استارت‌تر کامل برای تولید پنیر ليقوان، می‌تواند از گونه‌های *L. L. agilis*، *L. plantarum*، گروه *Enterococcus faecium* و گونه‌هایی از *Lactococcus* و *Leuconostoc* تشکیل شود.

واژه‌های کلیدی: پنیر ليقوان، باکتری‌های اسید لاکتیک، شناسایی، خصوصیات بیوشیمیایی

مقدمه

وابسته است. خصوصیات کیفی و حسی پنیر نظیر بافت، بو، طعم و... به عوامل مهمی از جمله به نوع شیر مصرفی، کیفیت میکروبی آن، تکنولوژی به‌کار رفته در ساخت پنیر و شرایط رسیدن آن بستگی دارد، اگرچه باکتری‌های اسید لاکتیک در تولید ترکیبات طعم‌دار و توسعه طعم نقش اساسی دارند، زیرا این باکتری‌ها قادر به تبدیل اجزای شیر به ترکیبات فراری هستند که نقش مهمی در گسترش طعم پنیر ایفا می‌کنند (پسونی و همکاران، ۲۰۰۳؛ هرروز و

پنیر ليقوان پنبیری نرم (دارای حدود ۶۰ درصد رطوبت) می‌باشد که با استفاده از شیر خام گوسفند و بز در دهکده ليقوان از توابع تبریز به روش سنتی تهیه می‌شود و به لحاظ خوش طعم بودن از مقبولیت زیادی برخوردار است. در تولید پنیر ليقوان استارت‌تر به آن اضافه نمی‌شود و تخمیر به فلور لاکتیکی شیر خام مصرفی

*- مسئول مکاتبه: mkhomeiri@yahoo.com

شرایط دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه گرگان منتقل شدند.

آماده‌سازی نمونه‌های پنیر: ۲۵ گرم پنیر به ۲۲۵ میلی‌لیتر محلول استریل سیترات سدیم ۲ درصد وزنی - حجمی اضافه و در دستگاه استومکر (مدل سیوارد^۵، آلمان) برای یک دقیقه با دور نرمال مخلوط گردید، سپس محلول رویی به‌عنوان رقت 10^{-1} برای تهیه رقت‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت، رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-5} در آب پیتونه استریل ۰/۱ درصد وزنی - حجمی تهیه شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های 10^{-4} و 10^{-5} تهیه شده به‌وسیله سمپلر بر سطح محیط جامد MRS^۶ و M17 تریق و به‌صورت سطحی کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌منظور ایجاد رشد بهینه برای باکتری‌های مزوفیل و دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به‌منظور رشد بهینه باکتری‌های گرمادوست در شرایط بی‌هوازی با استفاده از جار بی‌هوازی و گازپک (نوع A، آلمان) گرم‌خانه‌گذاری شدند. کشت‌ها در دو تکرار انجام شدند (لاسردا و همکاران، ۲۰۰۵؛ تورزلانز و همکاران، ۲۰۰۶). از کلنی‌های رشد یافته با اشکال مختلف بر محیط‌های کشت یاد شده، ۳ کلنی به‌صورت تصادفی برداشته و پس از ۲-۳ بار پاساژ بر محیط‌های کشت قبلی خالص‌سازی شدند و از نظر کاتالاز، گرم و مورفولوژی سلولی آزمایش گردیدند (گریکو و همکاران، ۲۰۰۵). از ۴۸۰ کلنی خالص شده، ۵۴ ایزوله براساس فراوانی مورفولوژیکی جهت شناسایی انتخاب شدند. برای نگهداری کوتاه‌مدت، کشت ذخیره ایزوله‌ها بر محیط کشت MRS جامد که به‌صورت شیب‌دار (آگار مورب) می‌باشد منتقل و هر ماه یک بار کشت مجدد انجام شد (عبدی و همکاران، ۲۰۰۵). برای نگهداری طولانی‌مدت، ایزوله‌های باکتریایی در محیط MRS مایع تلقیح و سپس لوله‌ها به‌منظور جدا کردن سلول‌های باکتریایی سانتریفوژ شدند. سوپرناتانت حذف و رسوب حاصل به نسبت (۷۰ به ۳۰) ۷۰۰ میکرولیتر از

همکاران، ۲۰۰۳؛ لینچ و همکاران، ۱۹۹۹). باکتری‌های اسید لاکتیک به‌طور گسترده در طبیعت پراکنده هستند، آنها فلور میکروبی غالب در شیر و فرآورده‌های لبنی می‌باشند تعدادی از گونه‌ها در تولید صنعتی محصولات لبنی دخالت دارند (آیاد و همکاران، ۲۰۰۴). در این گروه از باکتری‌ها، جنس‌هایی نظیر لاکتوباسیلوس^۱، لاکتوکوکوس^۲، پدیوکوکوس^۳ و لوکونستوک^۴ قرار دارند (تسروسکا و همکاران، ۲۰۰۲).

پنیر لیقوان یکی از مهم‌ترین و رایج‌ترین محصولات لبنی در ایران است که در همه نقاط کشور استفاده از آن پذیرفته شده و مورد توجه است و از شیر غیرپاستوریزه تهیه می‌شود. پنیر تهیه شده از شیر پاستوریزه دارای کیفیت بهداشتی بهتر و بافت یکنواخت‌تر است اما پاستوریزاسیون اثرات مخرب بر طعم دارد چرا که تعدادی از میکروبهایی که مسئول توسعه طعم پنیر هستند به‌وسیله پاستوریزاسیون حذف خواهند شد، راه‌حل این مشکل در تولید فرآورده با استفاده از شیر پاستوریزه، استفاده از استارتر بومی آن بعد از فرآیند پاستوریزاسیون می‌باشد (تورزلانز و همکاران، ۲۰۰۶). بنابراین با توجه به اهمیت باکتری‌های اسید لاکتیک به‌عنوان یکی از پارامترهای اصلی تشکیل خواص حسی (نظیر طعم و بافت و...) در پنیر لیقوان، هدف از انجام این پژوهش شناسایی گونه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در پنیر لیقوان بود که اولین مرحله برای توسعه یک استارتر خالص از گونه‌های شناسایی شده به‌منظور تولید پنیر لیقوان سالم و بافت یکنواخت با استفاده از شیر پاستوریزه در سطح صنعتی است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: در فصل پائیز، ۴ نمونه پنیر ۱ کیلوگرمی از پنیر سنتی لیقوان با دوره رسیدگی ۴ ماهه از چهار تولیدی واقع در دهکده لیقوان تبریز تهیه گردید، نمونه‌ها در

- 1- *Lactobacillus*
- 2- *Lactococcus*
- 3- *Pediococcus*
- 4- *Leuconostoc*

- 5- Seaward
- 6- Zeman-Rogosa-Sharp Agar

نهایی قند مورد نظر) انجام شد (اوکسوزتپ و همکاران، ۲۰۰۵؛ لاسردا و همکاران، ۲۰۰۵). تولید گاز دی‌اکسیدکربن از گلوکز در لوله آزمایش حاوی محیط کشت مایع فوق و لوله دورهام وارونه مورد بررسی قرار گرفت. برای تأمین شرایط بی‌هوازی ۱ میلی‌لیتر پارافین مایع استریل بر سطح محیط قندی اضافه گردید (تورزلانز و همکاران، ۲۰۰۶). همه آزمایش‌ها در دو تکرار انجام گرفت. نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی ایزوله‌های شناسایی شده با خصوصیات بیوشیمیایی باکتری‌های اسید لاکتیک در کتاب برگیس و کتاب جنس‌های باکتری‌های اسید لاکتیک مطابقت داده شد (اسنیث و همکاران، ۱۹۸۶؛ ود و هولزافل، ۱۹۹۵) و ایزوله‌ها در سطح جنس و گونه شناسایی شدند.

نتایج و بحث

همه ایزوله‌های شناسایی شده گرم مثبت، کاتالاز منفی و بدون اسپور بودند. همان‌طور که در جدول‌های ۱ تا ۴ مشاهده می‌شود براساس خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، ۶ جنس از گروه باکتری‌های اسید لاکتیک شامل جنس‌های لاکتوباسیلوس، استرپتوکوکوس^۳، اتروکوکوس، لاکتوکوکوس، لوکونوستوک و پدیوکوکوس در سطح گونه شناسایی شدند و ۷ ایزوله قابل شناسایی نبودند.

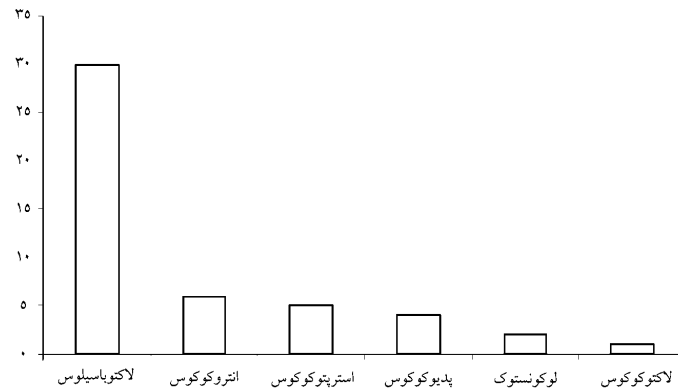
توزیع جنس‌های شناسایی شده باکتری‌های اسید لاکتیک: توزیع پراکندگی جنس‌های شناسایی شده از پنیر لیقوان در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل یاد شده مشاهده می‌شود ایزوله‌های شناسایی شده متعلق به جنس‌های لاکتوباسیلوس، اتروکوکوس، استرپتوکوکوس، پدیوکوکوس، لوکونوستوک و لاکتوکوکوس به ترتیب ۵۵/۵ (۳۰ ایزوله)، ۱۱/۱۱ (۶ ایزوله)، ۹/۲۵ (۵ ایزوله)، ۵/۵۵ (۳ ایزوله)، ۳/۷۰ (۲ ایزوله) و ۱/۸۵ (۱ ایزوله) درصد از کل ایزوله‌ها را تشکیل می‌دادند.

محیط کشت فوق به همراه ۳۰۰ میکرولیتر گلیسرول استریل ۵۰ درصد به لوله‌های اپندورف منتقل شد و بلافاصله در ازلت مایع منجمد گردید، لوله‌های یاد شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد به صورت منجمد نگهداری شدند (هولزافله و همکاران، ۲۰۰۱؛ پاپامانولی و همکاران، ۲۰۰۳).

آزمون‌های بیوشیمیایی: برای همه ایزوله‌ها تست کاتالاز و گرم انجام شد، خصوصیات مورفولوژی سلولی و تولید گاز از گلوکز با لوله دورهام بررسی شد و سپس ایزوله‌ها در گروه‌های فنوتیپی جداسازی شدند. کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی هموفرمتاتیو قادر به رشد در دمای ۱۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد به عنوان اتروکوکوس^۱ در نظر گرفته شدند و آزمون‌های شرمین شامل: توانایی رشد در pH=۹/۶، رشد در بایل^۲ ۴۰ درصد، رشد در ۶/۵ درصد نمک کلرور سدیم و بقا بعد از حرارت دادن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه برای تأیید بیشتر انجام شد (اسنیث و همکاران، ۱۹۸۶؛ تامیم، ۱۹۹۰؛ بادیس و همکاران، ۲۰۰۴). کوکسی‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی هموفرمتاتیو با آرایش سلولی تتراد به عنوان پدیوکوکوس در نظر گرفته شدند. کوکسی‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی هتروفرمتاتیو به عنوان لوکونوستوک و کوکسی‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی هموفرمتاتیو قادر به رشد در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد و عدم رشد در ۴۵ درجه سانتی‌گراد به عنوان لاکتوکوکوس شناسایی شدند. برای باسیل‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی، رشد در دمای ۱۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، تولید گاز از گلوکز انجام شد (اسنیث و همکاران، ۱۹۸۶؛ ود و هولزافل، ۱۹۹۵). به منظور شناسایی ایزوله‌ها در سطح گونه تخمیر کربوهیدرات‌ها شامل گلوکز، لاکتوز، ساکاروز، گالاکتوز، فروکتوز، ملی زیتوز، رافینوز، گزیلوز، آرابینوز، گلوکونات، سوربیتول، ریبوز، مانوز، مانیتول در محیط پایه با فرمول زیر پیگیری شد (۰/۸ درصد عصاره مخمر، ۰/۸ درصد ترپتون، ۱/۲ درصد پپتون، ۰/۱ درصد توئین و ۰/۰۰۴ درصد برموفنل بلو به عنوان معرف و ۲ درصد غلظت

1- *Enterococcus*
2- Bile

3- *Sterptococcus*



شکل ۱- توزیع پراکندگی جنس‌های باکتری‌های اسید لاکتیک شناسایی شده از پنیر لیقوان.

تورزلانز و همکاران، ۲۰۰۶؛ بادیس و همکاران، ۲۰۰۴). همه ایزوله‌های شناسایی شده به‌جز *L. Salvarius* که در گروه هموفرمنتاتیو اجباری قرار دارد، بقیه در گروه هتروفرمنتاتیو اختیاری طبقه‌بندی شده‌اند. در این جنس گونه‌های *L. Plantarum* *L. Agilis* *L. Paracasiae* *L. Intestinalis* *L. Acetotolerance* *L. Maltaromicus* و *Subsp Paracasiae* شناسایی شدند که به ترتیب ۱۳، ۸، ۱، ۱، ۱، ۲ و ۴ ایزوله از کل ایزوله‌های شناسایی شده جنس لاکتوباسیلوس را تشکیل می‌دادند. نتایج آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی‌ای شناسایی شده در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. لاکتوباسیلوس پاراکازئی زیرگونه پاراکازئی در محصولات لبنی مصری شناسایی شده که قدرت اسیدی‌کنندگی ضعیف و همچنین دارای فعالیت آنتی‌میکروبی بوده است (بادیس و همکاران، ۲۰۰۴). لاکتوباسیلوس‌ها به‌عنوان گونه‌های غالب در پنیرهای تهیه با شیرخام گزارش شده‌اند، زیرا این ارگانیزم‌ها قادرند که تحت شرایط انتخابی شدید نیز به رشد ادامه دهند و به دلیل ویژگی‌های پروتئولیتیک عالی، نقش اساسی در ایجاد خصوصیات حسی محصول از خود نشان دهند (تورزلانز و همکاران، ۲۰۰۶).

از ایزوله‌های شناسایی شده در این تحقیق، ۴۶ ایزوله (۸۵ درصد) از دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۸ ایزوله (۱۵ درصد) از دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد ایزوله شدند که این نشان می‌داد که غالب باکتری‌های اسید لاکتیک پنیر لیقوان گونه‌های مزوفیل هستند.

جنس‌های لاکتوباسیلوس، انتروکوکوس و پدیوکوکوس فلور لاکتیکی شناسایی شده توسط عبدی و همکاران (۲۰۰۵) در پنیر لیقوان بودند که لاکتوباسیلوس‌های مزوفیل، انتروکوکوس و پدیوکوکوس به ترتیب ۴۶، ۴۲ و ۱۲ درصد کل ایزوله‌ها را تشکیل می‌دادند. او همچنین فلور غالب لاکتیکی پنیر لیقوان را گونه‌های مزوفیل معرفی کرد (عبدی و همکاران، ۲۰۰۵). گریکو و همکاران، باکتری‌های اسید لاکتیک میله‌ای مزوفیل هموفرمنتاتیو (۹۴/۴ درصد) و هتروفرمنتاتیو (۵/۵ درصد) را به‌عنوان فلور غالب لاکتیکی در طول رسیدن سوسیس ساردینی معرفی نمودند (گریکو و همکاران، ۲۰۰۵). نتایج این تحقیق نیز با نتایج عبدی در پنیر لیقوان مشابهت داشت.

تعداد ۳۰ ایزوله به‌عنوان گونه‌های لاکتوباسیلوس شناسایی شدند که بیشترین درصد فراوانی (۵۵/۵ درصد) را در بین جنس‌های شناسایی شده به خود اختصاص می‌دادند غالب بودن لاکتوباسیلوس‌ها نیز در فرآورده‌های مختلف گزارش شده است (عبدی و همکاران، ۲۰۰۵).

جدول ۱- نتایج آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گونه‌های لاکتوباسیلوس شناسایی شده از پنیر لیقوان.

نام ایزوله شناسایی شده	ردیف	تعداد کل باکتری‌ها	تعداد باکتری‌های زنده	تعداد باکتری‌های مرده	تعداد باکتری‌های آزاد	تعداد باکتری‌های متصل	تعداد باکتری‌های آزاد	تعداد باکتری‌های متصل	تعداد باکتری‌های آزاد	تعداد باکتری‌های متصل	تعداد باکتری‌های آزاد	تعداد باکتری‌های متصل	تعداد باکتری‌های آزاد	تعداد باکتری‌های متصل	تعداد باکتری‌های آزاد	تعداد باکتری‌های متصل	تعداد باکتری‌های آزاد	تعداد باکتری‌های متصل	تعداد باکتری‌های آزاد	تعداد باکتری‌های متصل	
لاکتوباسیلوس آگیسیس	۴۷۵	+	+	-	۲۰	M17	+	+	-	-d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس آگیسیس	۴۷۲	+	+	-	۲۰	M17	+	+	-	-d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس آگیسیس	۲۲۹	+	+	-	۲۷	MRS	+	+	-	+d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس آگیسیس	۲۸۵	+	+	-	۲۷	M17	+	+	-	+d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس آگیسیس	۱۲۷	+	+	-	۲۷	MRS	+	+	-	+d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس آگیسیس	۱۹۹	+	+	-	۲۷	M17	+	+	-	-d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس آگیسیس	۶۱	+	+	-	۲۰	MRS	+	+	-	-d	w+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس آگیسیس	۴۱۷	+	+	-	۲۰	M17	+	+	-	+d	-f	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس آگیسیس	۴۷۳	+	+	-	۲۰	M17	+	+	-	d+	w+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس آگیسیس	۴۸۶	+	+	-	۲۰	MRS	+	+	-	-d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس آگیسیس	۲۴۳	+	+	-	۲۷	MRS	+	+	-	-d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس آگیسیس	۱۹۴	+	+	-	۲۷	MRS	+	+	-	-d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس آگیسیس	۱۶۲	+	+	-	۲۷	MRS	+	+	-	-d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس پلاتنارم	۴۰۳	+	+	-	۴۲	MRS	+	+	-	+	+	+	-d	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس پلاتنارم	۱	+	+	-	۲۰	M17	+	+	-	w+	+	+	+d	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس پلاتنارم	۷۸	+	+	-	۲۰	MRS	+	+	-	+	+	+	-d	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس پلاتنارم	۴۱۶	+	+	-	۲۰	M17	+	+	-	+	+	+	-d	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس پلاتنارم	۴۹۷	+	+	-	۲۰	M17	+	+	-	+	+	+	-d	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس پلاتنارم	۵۹	+	+	-	۲۰	MRS	+	+	-	+	+	+	-d	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس پلاتنارم	۱۶۶	+	+	-	۲۷	MRS	+	+	-	+	+	+	+d	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس پلاتنارم	۴۲۲	+	+	-	۲۰	MRS	+	+	-	w+	+	+	-d	+	+	+	+	+	+	+	+

نتیجه به دست آمده با نتیجه جدول شناسایی متفاوت است. W واکنش ضعیف، D (در جدول شناسایی ۱۱-۸۹ درصد بیشترین‌ها مثبت هستند).

جدول ۲- نتایج آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گرده‌های لاکتوباسیلوس شناسایی شده.

تخمیر قند از												
نام بزوله شناسایی شده	موتور	رنگ	تغییر در ۱۵ دقیقه	تغییر در ۳۰ دقیقه	تغییر در ۴۵ دقیقه	تغییر در ۱ ساعت	تغییر در ۲ ساعت	تغییر در ۳ ساعت	تغییر در ۴ ساعت	تغییر در ۵ ساعت	تغییر در ۶ ساعت	تغییر در ۷ ساعت
لاکتوباسیلوس مانتارومیکروس	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس مانتارومیکروس	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
لاکتوباسیلوس مانتارومیکروس	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس مانتارومیکروس	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس پاراکازنی زیر	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
گونه پاراکازنی	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
لاکتوباسیلوس پاراکازنی زیر	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
گونه پاراکازنی	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
لاکتوباسیلوس استولانس	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس اینتستینالیس	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس سالیاریوس	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

نتیجه به دست آمده با نتیجه جدول شناسایی متفاوت است. W واکنش ضعیف. O آزمون در جدول شناسایی تعیین نشده است. D در جدول شناسایی ۸۹-۱۱ درصد از استرین‌ها مثبت هستند.

هستند (اوکسوزتپ و همکاران، ۲۰۰۵). بیشتر لاکتوکوکوس‌ها در طول رسیدن و بعد از نمک زدن پنیرها خواهند مرد و به تدریج جای خود را به لاکتوباسیلوس‌ها که مقاوم به شرایط اسیدی هستند، می‌دهند. اولین عملکرد لاکتوکوکوسی‌ها ابتدا تبدیل لاکتوز به اسید لاکتیک است و در مرحله بعد تشکیل دی‌استیل و دیگر ترکیبات رایحه‌دار می‌باشد. از طرفی اگرچه لاکتوکوکوس‌ها اسیدی‌کننده‌های ضعیف هستند اما به دلیل توانایی اسیدی‌کنندگی سریع مسئول اسیدی‌کنندگی ابتدایی می‌باشند که تشکیل دلمه و خروج آب پنیر را تعیین نموده و از رشد باکتری‌های نامطلوب جلوگیری می‌کنند (تورزلانز و همکاران، ۲۰۰۶؛ بادیس و همکاران، ۲۰۰۴؛ آیاد و همکاران، ۲۰۰۴).

از ایزوله‌های شناسایی شده، دو ایزوله کروی شکل با تخمیر هتروفرمنتاتیو (تولید گاز از گلوکز) و الگوی تخمیر کربوهیدرات‌ها (جدول ۳) به‌عنوان لوکونوستوک مزترئوئیدس زیرگونه دکسترانیکم^۹ و لوکونوستوک مزترئوئیدس زیرگونه مزترئوئیدس^{۱۰} شناسایی شدند. هر چند گونه‌های لوکونوستوک دارای قدرت اسیدی‌کنندگی و پروتئولیتیک ضعیف هستند اما به دلیل تولید ترکیبات معطر شاخص مثل اتانل، استوئین و دی‌استیل دارای اهمیت می‌باشند (تامیم، ۱۹۹۰). از این رو بر این اساس یکی از دلایل عطر و طعم موجود در پنیر لیقوان را می‌توان به این جنس نسبت داد.

از انتروکوکوسی‌های شناسایی شده، ۱ ایزوله به گونه *انتروکوکوس فکالیس*^{۱۱} و ۵ ایزوله به گروه فاسیوم تعلق داشتند که شامل ۲ نژاد *انتروکوکوس دورانس*^{۱۲}، ۲ نژاد *انتروکوکوس هایره*^{۱۳} و ۱ نژاد *انتروکوکوس فاسیوم*^{۱۴}

خصوصیات بیوشیمیایی ۵ ایزوله شناسایی شده استریتوکوکوس در جدول ۳ آمده است که ۲ ایزوله به‌عنوان *استریتوکوکوس ترموفیلوس*^۱، ۱ ایزوله *استریتوکوکوس دونئی*^۲ و ۲ ایزوله *استریتوکوکوس اورالیس*^۳ شناسایی شدند. حضور ۳ نژاد شناسایی شده *استریتوکوکوس دونئی* و *استریتوکوکوس اورالیس* از پنیر لیقوان ممکن است دلیلی بر شرایط غیربهداشتی مرحله شیردوشی باشد. *استریتوکوکوس یوریریس*^۴ از پنیر فرسکو مکزیکی شناسایی شده که به گروه استریتوکوکوس‌های دیگر تعلق دارد که حضور آن همراه *استریتوکوکوس اوویوم*^۵ به شرایط شیردوشی غیربهداشتی ارتباط داده شده است (تورزلانز و همکاران، ۲۰۰۶). *استریتوکوکوس ترموفیلوس* قبلاً از شیر بز الجزایری و محصولات لبنی مصری ایزوله شده است (بادیس و همکاران، ۲۰۰۴؛ آیاد و همکاران، ۲۰۰۴).

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود یک ایزوله به‌عنوان *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس*^۶ یا *لاکتوکوکوس گارویه*^۷ شناسایی شد که آزمایش‌های بیوشیمیایی قادر به تفکیک دو گونه از هم نبودند. ایزوله یاد شده از محیط M17 و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد ایزوله گردید. *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *گارویه* در محصولات لبنی مختلف شناسایی شده‌اند (آیاد و همکاران، ۲۰۰۴؛ هرروز و همکاران، ۲۰۰۳؛ تورزلانز و همکاران، ۲۰۰۶). بررسی فلور لاکتیکی پنیرهای مختلف نظیر پنیر تولوم^۸ نشان داده که گونه‌های *استریتوکوکوس* در ابتدای دوره رسیدن غالب

1- *S. Thermophilus*

2- *S. Downei*

3- *S. Oralis*

4- *S. Uberis*

5- *S. Ovium*

6- *Lac. Lactis* Spp *Lactis*

7- *Lac. Garviae*

8- Tulum Cheese

9- *Leu. Mesenteroides* Subsp *Dextranicum*

10- *Leu. Mesenteroides* Subsp *Mesenteroids*

11- *Enterococcus Faecalis*

12- *Enterococcus Durans*

13- *Enterococcus Hirae*

14- *Enterococcus Haecium*

دارای الگوی تخمیر فروکتوز متفاوتی می‌باشند. هر ۳ ایزوله از محیط MRS آگار ایزوله شدند. پدیوکوکوس پنتاساکتوس، پدیوکوکوس دامنوس^۵ و پدیوکوکوس پاروالوس^۶ از گونه‌های شناسایی شده در محصولات لبنی می‌باشند (بادیس و همکاران، ۲۰۰۴؛ آیاد و همکاران، ۲۰۰۴). پدیوکوکوس‌ها در استارترهای لبنی استفاده نمی‌شوند اگرچه آنها می‌توانند در پنیر با دوره رسیدگی رشد کرده و باقی‌مانده لاکتوز را برای دوره طولانی تخمیر کنند (عبدی و همکاران، ۲۰۰۵).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که یک کشت مخلوط استارتی برای تولید پنیر لیقوان به روش صنعتی باید شامل گونه‌های لاکتوباسیلوس آگیلیس، لاکتوباسیلوس پلاننارم، گروه انتروکوکوس فاسیوم و گونه‌هایی از لاکتوکوکوس و لوکونوستوک به نسبت‌های مشخصی باشد. تحقیقات بیشتر برای یافتن سویه‌های تشکیل‌دهنده به‌طور دقیق‌تر و دستیابی به نسبت آنها لازم است.

بودند (نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی انتروکوکوسی‌ها در جدول ۳ آمده است). انتروکوکوس‌ها بعد از لاکتوباسیلوس‌ها بیشترین فلور لاکتیکی پنیر لیقوان را به خود اختصاص دادند. حضور انتروکوکوس فاسیوم، انتروکوکوس فکالیس^۱ و انتروکوکوس دورانس^۲ در شیر خام و پنیر تهیه شده از شیر خام معمول است. انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس دورانس از پنیر فرسکوی مکزیکی و پنیر مصری و پنیر لیقوان شناسایی شده‌اند که انتروکوکوس فاسیوم، گونه غالب در میان ایزوله‌های انتروکوکوس در پنیرهای یاد شده گزارش شده است (آیاد و همکاران، ۲۰۰۴؛ تورزلانز و همکاران، ۲۰۰۶). این نتایج، با نتایج این تحقیق مشابهت داشت. انتروکوکوس‌ها از فعالیت پروتولیتیک بالایی به‌خصوص بر کازئین و دیگر پروتئین‌های شیر، همچنین فعالیت لیپولیتیک قوی برخوردارند به‌همین دلیل انتروکوکوس‌ها می‌توانند نقش مهمی در توسعه طعم پنیر لیقوان داشته باشد (عبدی و همکاران، ۲۰۰۵). تعدادی از نژادهای انتروکوکوس به‌عنوان استارتر به‌صورت تجاری استفاده می‌شوند برای مثال استفاده از انتروکوکوس فاسیوم (K77D) به‌عنوان یک استارتر در دانمارک مورد تأیید قرار گرفته است (تورز-لانز و همکاران، ۲۰۰۶).

یک ایزوله به‌عنوان پدیوکوکوس پنتاساکتوس زیرگونه اینترمدیوس^۳ و دو ایزوله به‌عنوان پدیوکوکوس اینوپیناتوس^۴ شناسایی شدند که همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، دو ایزوله پدیوکوکوس اینوپیناتوس

5- *P. Damnousus*
6- *P. Parvalus*

1- *Enterococcus Faecalis*
2- *Enterococcus Durans*
3- *P. Pentosaceus Subsp Intermedius*
4- *P. Inopinatus*

جدول ۳- نتایج آزمایش های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گوندهای استرپتوکوکوس، لاکتوکوکوس و اکتروکوکوس شناسایی شده از پنیر لیقوان.

نام ابزاره شناسایی شده	مورفولوژی	تاریخ	تاریخ	تاریخ	تخمیر قند از															
					گلوکز	ساکاروز	مالیک	سوربیتول	رشته	آرام	گلیسرول	کازئین	گالاکتوز	نورمالن	مل					
استرپتوکوکوس ترموفیلوس	کروی تک، چفت و خوشه‌ای	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
استرپتوکوکوس ترموفیلوس	کروی تک، چفت و بیشتر خوشه‌ای	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
استرپتوکوکوس دولی	کروی تک، چفت و خوشه‌ای	+	0	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
استرپتوکوکوس اورالیس	کروی تک، چفت و رشته‌ای	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
استرپتوکوکوس اورالیس	کروی تک، چفت و خوشه‌ای	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
لوکتوکوستوک مرتزیدیس	کروی خوشه‌های بزرگ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
زیروگوه دکسترا لیکم																				
لوکتوکوستوک مرتزیدیس	کروی تک، چفت، بیشتر خوشه‌ای	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
زیروگوه مرتزیدیس																				
لاکتوکوس - لاکتوس زبر	کروی تک، چفت، رشته و خوشه‌ای	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
گونه لاکتیس																				
اکتروکوکوس دورانس	کروی تک کم، چفت، خوشه‌ای	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اکتروکوکوس دورانس	کروی تک کم، چفت، خوشه‌ای	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اکتروکوکوس - هاپره	کروی تک، چفت، خوشه‌ای	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اکتروکوکوس - هاپره	کروی تک، رشته ای، بیشتر خوشه‌ای	+	+	+	w+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اکتروکوکوس فاسیوم	کروی با آرایش خوشه‌ای	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اکتروکوکوس - تکالیس	کروی تک، چفت، خوشه‌ای	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

نتیجه به دست آمده با نتیجه جدول شناسایی متفاوت است. A آزمون انجام شده در جدول شناسایی وجود نداشت. C نتیجه در جدول شناسایی معمولاً + می‌باشد. W واکنش ضعیف. X آزمون مربوطه انجام نشد.

جدول ۴- نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی گونه‌های پدیوکوکوس شناسایی شده از پتیر لیقوان.

نام باکتری شناسایی شده	کاربون	پروتئین	گلیسرین	گلیسرول	گلیسرول	گلیسرول	گلیسرول	گلیسرول	گلیسرول	گلیسرول	تخمیر قند از	
											گلیسرول	گلیسرول
پدیوکوکوس اینویناتوس	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	رشد در ۱۵ درصد
پدیوکوکوس اینویناتوس	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	رشد در ۸٪ pH
پدیوکوکوس پتاساکتوس زیر	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	رشد در ۵۵ درصد سانتیگراد
گونه اینترمیدوس	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	رشد در ۳۵ درصد سانتیگراد
												رشد در ۱۰ درصد
												رشد در ۲۰ درصد
												رشد در ۴۰ درصد
												رشد در ۵۵ درصد

نتیجه به دست آمده با نتیجه جدول شناسایی متفاوت است. A آزمون انجام شده در جدول شناسایی وجود نداشت. W واکنش ضعیف.

منابع

1. Abdi, R., Sheikh-Zeinoddin, M., and Soleimani-Zad, S. 2005. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian Lighvan cheese. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9: 1: 99-103.
2. Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H., and El-Soda, M. 2004. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Journal of Food Microbiology*, 21: 715-725.
3. Badis, A., Guetarni, D., Mussa Boudjema, B., Henni, D.E., and Kihal, M. 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Journal of Food Microbiology*, 21: 579-588.
4. Greco, M., Mazzette, R., De Santis, E.P.L., Corona, A., and Cosseddu, A.M. 2005. Evaluation and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausage. *Journal of Meat Science*, 69: 733-739.
5. Herreros, M.A., Fresno, J.M., Gonzalez Prieto, M.J., and Tornadizo, M.E. 2003. Technological characterization of Lactic Acid Bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *International Dairy Journal*, 13: 469-479.
6. Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., and Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition, 73: 365-373.
7. Lacerda, I.C.A., Miranda, R.L., Borelli, B.M., Nunnes, A.C., Nardi, R.M.D., Lachance, M., and Rosa, C.A. 2005. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 105: 213-219.
8. Lynch, C.M., Muir, D.D., Banks, J.M., McSweeney, P.L.H., and Fox, P.F. 1999. Influence of adjunct cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on cheddar cheese ripening. *Journal Dairy Science*, 82: 1618-1628.
9. Oksuztepe, G., Bahri, P., and Calicioglu, M. 2005. Identification and Distribution of lactic acid bacteria during the ripening of Savak Tulum cheese. *Turk Journal Vet Anim Science*, 29: 873-879.
10. Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., and Kotzekidou, P. 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Journal of Meat Science*, 65: 859-867.
11. Psoni, L., Tzanetakis, N., and Lipoulou-Tzaretaki, E. 2003. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese form raw goat's milk. *Journal of Food Microbiology*, 20: 575-589.
12. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Williams & Wilkins, Baltimore, 634p.
13. Tamime, A.Y. 1990. Lactic acid bacteria. P131-155, In: Robinson, R.K. (Eds), *Dairy Microbiology, the microbiology of milk products*, Vol. I. Elsevier Applied Science Publishers, London.
14. Torres-Llanez, M.J., Vallejo-Cordoba, B., Diaz-cinco, M.E., Mazorra-Manzano, M.A., and Gonzalez-Cordova, A.F. 2006. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Journal of Food Control*, 17: 683-690.
15. Tserovska, L., Stefanova, S., and Yordanova, T. 2002. Identification of Lactic Acid Bacteria isolated from Katyk, goat's milk and cheese. *Journal of Culture Collection*, 3: 48-52.
16. Wood, B.J.B., and Holzapfel, W.H. 1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Chapman & Hall, Blackie and professional, 398p.