مجله تحقیقات مهندسی کشاورزی/جلد ۱٤/ شماره ۳/سال ۱۳۹۲/ص ۹٦-۸۳

# جداسازی و شناسایی باکتری‌های لاکتیکی موجود در پنیر سنتی کوزه

**مصطفی قادری[*]، اصلان عزیزی، حمید عزت‌پناه، محمدامین حجازی و امیرهومن حمصی[**]**

[*] نگارنده مسئول، نشانی: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه تخصصی مهندسی علوم و صنایع غذایی، تلفن ۴۴۸۶۵۴۸۴(۰۲۱)، پیام‌نگار: mostafa.ghaderi64@gmail.com

[**] به‌ترتیب کارشناس ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران؛ دانشیار مهندسی علوم و صنایع غذایی، مرکز تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی؛ دانشیار گروه تخصصی مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران؛ دکتری مهندسی علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور؛ و دانشیار گروه تخصصی مهندسی علوم و صنایع چوب، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۱۴

## چکیده

**پنیر کوزه یکی از پنیرهای سنتی ایران است که به دلیل داشتن عطر و طعم قوی بازارپسندی بالایی دارد. در تهیهٔ این نوع پنیر از مایهٔ آغازگر استفاده نمی‌شود. یکی از مهم‌ترین عوامل دخیل در رسیدن پنیر و توسعهٔ عطر و طعم آن، فلور لاکتیکی آن است و از این رو شناسایی باکتری‌های لاکتیکی مؤثر در رسیدن این نوع پنیر ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش، پنیر کوزه به روش سنتی رایج در مناطق جنوبی استان آذربایجان غربی تولید شد و دورهٔ رسیدن را، به مدت سه ماه، در زیر خاک طی کرد. باکتری‌های لاکتیکی با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی در حد گونه با روش‌های فنوتیپی و 16s rDNA شناسایی شدند. از ۵۱ جدایهٔ باکتری‌های لاکتیکی شناسایی شده، معلوم شد که گونه‌های غالب متعلق به جنس *لاکتوباسیلوس* (۳۷/۳ درصد) و *انتروکوکوس* (۲۵/۵ درصد) هستند و گونه‌های دیگر به جنس *لاکتوکوکوس* (۱۹/٦ درصد)، *لوکونوستوک* (۹/۸ درصد) و *پدیوکوکوس* (۷/۸ درصد) تعلق دارند. مهم‌ترین گونه‌های غالب جداسازی شده شامل *انتروکوکوس فاسیوم* (۸ جدایه)، *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونهٔ *لاکتیس* (۷ جدایه)، *لاکتوباسیلوس کازئی* زیرگونهٔ *کازئی* (٤ جدایه) و *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیکی* (٤ جدایه) بودند.**

## واژه‌های کلیدی

**باکتری‌های لاکتیکی، پنیر، پنیر کوزه، جداسازی، شناسایی**

## مقدمه

پنیر یکی از مهم‌ترین محصولات شیری است که ارزش غذایی بالایی دارد. از یک سو ویژگی‌های تغذیه‌ای و از سوی دیگر ویژگی‌های ارگانولپتیک خاص آن از جمله عطر، طعم، بافت و غیره که خود تحت تأثیر مراحل تهیه از شیر اولیه تا محصول کاملاً رسیده قرار دارد، موجب تمایز این محصول از سایر فرآورده‌های شیری شده است (Mortazavi *et al.*, 2005).

عوامل متعدد روی خواص ارگانولپتیک پنیر مؤثر هستند، مانند: نوع شیر، کیفیت میکروبی آن، روش تولید و شرایط رسیدن پنیر. ولی باکتری‌های لاکتیکی حائز اهمیت خاصی هستند و در ایجاد عطر و طعم محصول نقشی اساسی دارند (Beresford *et al.*, 2001).

محصولات شیری سنتی مانند پنیر که تولید آن‌ها با فرایند حرارتی شیر همراه نیست، بستر بسیار مناسبی برای رشد و فعالیت باکتری‌های لاکتیکی بومی هستند

(Urabach, 1995). سویه‌های بومی به طور معمول در فلور میکروبی شیر در منطقهٔ تولید حضور دارند و از این طریق وارد روند تولید پنیر می‌شوند و در ایجاد عطر و طعم تأثیر بسزایی دارند (Fernandez-Garcia *et al.*, 2004).

در ایران یکی از مشهورترین پنیرهای سنتی، پنیر کوزه است که در مناطق شمال‌غربی کشور تولید می‌شود و به دلیل داشتن عطر و طعم مطلوب و قوی، بازارپسندی بالایی دارد. شکل ١ پنیر کوزهٔ آمادهٔ مصرف را نشان می‌دهد.

**شکل ١- پنیر کوزهٔ آمادهٔ مصرف**

این نوع پنیر معمولاً از شیر خام گوسفند و بدون افزودن مایهٔ آغازگر تهیه می‌شود. از این رو، فلور طبیعی شیر خام منطقه یکی از مهم‌ترین عوامل رسیدن و تولید عطر و طعم قوی این پنیر است. جدایه‌های بومی لاکتیکی موجود در فلور شیر از عوامل مهم توسعه دهندهٔ عطر و طعم خاص این نوع پنیر هستند (Fox *et al.*, 2000). پنیرهای تولید شده از شیر خام (به ویژه شیر گوسفند)، در مقایسه با پنیر حاصل از شیر پاستوریزه، عطر و طعم بهتری دارند (Buffa *et al.*, 2001).

اخیراً مطالعات فراوانی در مورد فلور طبیعی پنیرهای سنتی انجام و مشاهده شده است که باکتری‌های لاکتیکی، فلور غالب را در رسیدن این پنیرها تشکیل می‌دهند.

در سال ٢٠٠٨، تحقیق جامعی در ارتباط با پنیرهای سنتی رایج در کشور ترکیه انجام و طی آن گفته شد که پنیر تولوم[1] رتبهٔ سوم تولید در این کشور را دارد. این پنیر از لحاظ منبع شیر خام، روش تولید و غیره شباهت زیادی با پنیر کوزه دارد. گزارش ارائه شده فقط به تعداد سویه‌های میکروبی و برخی خواص فیزیکی و شیمیایی اشاره دارد (Kamber, 2008).

در ایران نیز در سال ١٣٨۴ برای نخستین بار ویژگی‌های شیمیایی پنیر کوزه بررسی شد که

1- Tulum

نتایج آزمون‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است (Hesami-Rad, 2006).

مشاهده شده است که در ماه اول از رسیدن پنیر تولوم (همان پنیر کوزه که در کشور ترکیه تهیه می‌شود)، لاکتوکوس‌ها غالب‌اند ولی بعد از آن تا خاتمهٔ دوره رسیدن، لاکتوباسیل‌ها جمعیت غالب را تشکیل می‌دهند. سویه‌های غالب جداسازی شده عبارت‌اند از: *لاکتوباسیلوس کازئی* زیرگونهٔ *کازئی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونهٔ *لاکتیس*، *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونهٔ *کرموریس* و *لویکونوستوک مزنتروئیدس* زیرگونهٔ *کرموریس* (Oksuztepe *et al.*, 2005).

**جدول ۱- مقایسهٔ میانگین ویژگی‌های شیمیایی اندازه‌گیری شده در پنیر سنتی کوزه**

| نوع پنیر | درصد ترکیبات | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | پروتئین | چربی | مادهٔ خشک | رطوبت | SNF | چربی در مادهٔ خشک |
| پنیر گوسفندی | ۲۶a | ۲۵/۲b | ۵۷/۱a | ۴۲/۹a | ۳۲/۴a | ۴۴/۲be |
| پنیر گاوی | ۱۸/۳b | ۲۱/۸b | ۵۳/۶a | ۴۶/۵۶a | ۳۲/۵۲a | ۴۷/۱abc |
| پنیر بز | ۱۹/۲ | ۲۴/۸ab | ۵۲/۳a | ۴۷/۶a | ۲۶/۴a | ۴۷/۴abc |
| پنیر گاومیش | ۲۲/۵ab | ۲۶/۶ab | ۵۵/۱a | ۴۴/۹a | ۳۰/۹a | ۴۸/۳ab |
| پنیر کوزه (مناطق دشت) | ۲۲/۴ab | ۲۶/۷a | ۵۵/۱a | ۴۴/۸a | ۳۱/۷a | ۴۸/۲ab |
| پنیر کوزه (مناطق کوهستانی) | ۲۲/۶ab | ۲۴/۸b | ۵۳/۷a | ۴۶/۳a | ۲۸a | ۴۶abc |

در هر ستون میانگین‌های دارای حرف مشترک، در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

در ایران، نوید قاسمی‌زاد و همکاران (Navid-Ghasemizad *et al.*, 2009) باکتری‌های لاکتیکی پنیر سنتی لیقوان را بررسی کرده و گزارش دادند که جمعیت میکروبی لاکتوباسیل‌ها در پنیر رسیده به حداکثر خود رسیده است.

فرجنیا و همکاران (Farajnia *et al.*, 2009)، گونه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* را به عنوان گونه‌های غالب در پنیر سنتی لیقوان معرفی کرده و پس از جداسازی برای تعیین ویژگی‌های کاربردی، از نظر تولید اسید و خواص پروتئولیتیکی در شیر مورد ارزیابی قرار دادند. گونه‌های انتخاب شده در این تحقیق خواص ذاتی مهمی را نشان دادند و نه تنها برای کاربردهای عملی (به عنوان آغازگر یا آغازگر همراه) مهم هستند، بلکه ممکن است مجموعهٔ ژنتیکی گسترده‌ای را برای طراحی گونه‌های تغییر یافته ژنتیکی با ویژگی‌های مورد نظر تأمین کنند.

بخش مبهم و ناشناخته در ایجاد ویژگی‌های حسی پنیر کوزه، تنوع گونه‌های لاکتیکی و تغییرات آن‌ها در مراحل فرآوری پنیر است که با پشت سر گذاشتن هر کدام از مراحل، اهمیت بیشتری پیدا می‌کنند و آگاهی از آن ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این پژوهش، علاوه بر معرفی پنیر کوزه به عنوان یکی از پنیرهای سنتی ایران، دستیابی به فلور لاکتیکی آن است تا بتوان از گونه‌های جداسازی شده در این پژوهش، برای تولید پنیر کوزه در مقیاس صنعتی، یا پنیری مشابه با پنیر کوزه، استفاده کرد.

## مواد و روش‌ها

### مواد

#### مواد مصرفی

برای جداسازی اولیهٔ باکتری‌های لاکتیکی، از محیط‌های کشت اختصاصی آن‌ها، که در جدول شمارهٔ ۲ ذکر شده‌اند، استفاده شد. کلیهٔ محیط‌های کشت و

کربوهیدرات‌های استفاده شده در این پژوهش از شرکت مرک[1] آلمان تهیه شدند.

**تجهیزات**

سانتریفوژهای استفاده شده از انواع یخچال‌دار و مدل‌های Megafuge 6000 و Micro High Speed vs-15000 CFNII بودند. برای واکنش زنجیرهٔ پلیمراز از دستگاه PCR مدل Touchgene Gradient و برای تفکیک قطعات تکثیر یافتهٔ ژن از دستگاه الکتروفورز Biorad و برای عکس‌برداری از ژل از دوربین Biometra استفاده شد.

**روش‌ها**

**روش تهیهٔ پنیر کوزه**: پنیر کوزه به دلیل تنوع در ذائقه‌ها به روش‌های مختلف، که تفاوت‌های کمی دارند، تولید می‌شود. برای اجرای این پژوهش، پنیر کوزه در اواخر تابستان طبق روش سنتی رایج، در روستاهای حوالی شهر سردشت (مراتع بیوران[2]) واقع در منطقهٔ جنوبی استان آذربایجان غربی، تولید شد. نمودار ۱ مراحل تهیهٔ پنیر کوزه را نشان می‌دهد.

**نمودار ۱- شمای تهیهٔ پنیر کوزه**

تهیهٔ شیر خام گوسفندی
↓
گذراندن از صافی پارچه‌ای
↓
افزودن مایهٔ قارچی رنت
↓
تشکیل دلمه
↓
خروج آب‌پنیر ← حرارت دادن دلمه تا دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه
↓
جداسازی دلمه
↓
فرم‌دهی دلمه به صورت قرص
↓
نگهداری به مدت ۱ روز (در دمای اتاق)
↓
رنده‌کردن دلمه
↓
پاشیدن ۵ درصد نمک به صورت خشک
↓
پرکردن کوزه‌های سفالی از پنیر همراه با فشار
↓
قرار دادن کوزه به صورت وارونه در زیر خاک به عمق ۱ متر با دمای حدود ۷-۳ درجهٔ سلسیوس
↓
گذشت ۳ ماه تا رسیدن پنیر

**روش نمونه‌گیری:** نمونه‌ای از پنیر رسیده، که ۳ ماه از دوره رسیدن را در زیر خاک گذرانده بود، تهیه شد. از پنیر طبق استاندارد AOAC 955.30 نمونه‌برداری شد. برای رعایت بهداشت و پیشگیری از تغییرات ناخواسته در تعادل فلور میکروبی، نمونه در بطری‌های درپوش‌دار استریل و در دمای ۴-۱ درجهٔ سلسیوس با استفاده از

1- Merck
2- Bewran

cool box حاوی کیسه یخ[1] به آزمایشگاه انتقال داده شد (Fox *et al.*, 2000).

**جداسازی باکتری‌های لاکتیکی:** برای تهیه رقت از نمونهٔ پنیر، از سرم فیزیولوژیک استریل صورت (محلول ۰/۹ درصد نمک NaCl) استفاده شد (Harrigan, 1998). پس از آن ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه شده با سمپلر بر سطح هر پلیت تزریق و به صورت پورپلیت[2] کشت داده شد. شرایط کشت و گرم‌خانه گذاری نمونه‌ها در جدول ۲ خلاصه شده است.

**جدول ۲- شرایط کشت و گرم‌خانه گذاری نمونه مورد آزمایش (Fox *et al.*, 2000)**

| گروه میکروارگانیسم هدف | نوع محیط کشت | شرایط گرمخانه گذاری | | |
|---|---|---|---|---|
| | | اکسیژن | دما (درجهٔ سلسیوس) | زمان (ساعت) |
| *لاکتوکوکوس* | M 17 آگار | هوازی | ۳۰ | ۷۲ |
| *انتروکوکوس* | KAA آگار | هوازی | ۳۷ | ۲۴ |
| *لاکتوباسیلوس* | Rogosa آگار | کم‌اکسیژن | ۳۰ | ۷۲ |
| *لوکونوستوک* | MRS+vancomycin آگار | هوازی | ۳۰ | ۷۲ |
| کل باکتری‌های لاکتیکی | MRS آگار | هوازی | ۳۰ | ۷۲ |

پس از سپری شدن دورهٔ گرم‌خانه گذاری، کلنی‌های رشد یافته در هر پلیت شمارش شدند. کلنی‌های انتخاب شده از پلیت‌هایی که به طور متوسط ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی در آن‌ها شمارش شده بود، برداشته و همانند شرایط اولیه روی همان نوع محیط کشت، به صورت سطحی کشت داده شدند (Lopez-Diaz *et al.*, 2000).

پس از حصول اطمینان از خالص بودن کلنی‌ها، آزمون‌های مورد نظر اجرا شد. به منظور نگهداری کوتاه‌مدت، کشت ذخیره جدایه‌ها به محیط کشت MRS آگار به صورت آگار مورب[3] منتقل گردید. آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم و کاتالاز برای جدایه‌ها اجرا شد و جدایه‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی به عنوان باکتری‌های لاکتیکی در نظر گرفته شدند (Walter & Hertel, 2009).

**شناسایی جدایه‌ها در حد جنس:** با توجه به امکانات و تجهیزات در دسترس، برای شناسایی باکتری‌های لاکتیکی از روش‌های فنوتیپی شامل بررسی‌های مورفولوژیکی و آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده شد.

**شناسایی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی:** برای شناسایی باکتری‌های لاکتیکی در حد جنس، آزمون‌های رشد در محیط BHI براث در دمای ۱۰ و ۴۵ درجهٔ سلسیوس، pH=۹/۶ و pH=۴/۴ و محیط حاوی ۶/۵ درصد نمک NaCl و همچنین تولید گاز از گلوکز در محیط MRS براث به اجرا در آمدند. به همین منظور یک لوپ از هر یک از جدایه‌ها به محیط‌های فوق انتقال داده شد؛ لوپ‌ها در دمای مورد نظر گرم‌خانه گذاری شدند. برای طبقه‌بندی جنس‌ها از الگوی کتاب باکتری‌های لاکتیکی (Salminen, 1998) استفاده شد.

**شناسایی مولکولی جدایه‌ها**

**استخراج DNA**: DNA از نمونه‌هایی استخراج شد که به مدت ۲۴ ساعت در محیط MRS مایع کشت داده شده بودند. ۱۰ میلی‌لیتر از کشت‌های باکتریایی با شتاب ۷۰۰۰۰ متر بر مجذور ثانیه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی آن دور ریخته شد. برای استخراج DNA از پلیت‌ها استفاده شد. برای لیز کردن سلول‌ها از بافر لیز استفاده شد. حجم مواد مورد استفاده در جدول ۳ آورده شده است.

1- Ice Bag
2 -Pour Plate
3- Slant Agar

**جدول ٣- حجم مواد تشکیل دهندۀ بافر لیز**

| مواد تشکیل دهندۀ بافر لیز | حجم |
|---|---|
| تریس ۱ مولار با pH=۷/۵ | ۱ میلی‌لیتر |
| کلرید سدیم ۵ مولار | ۱ میلی‌لیتر |
| EDTA ۰/۵ مولار | ۱ میلی‌لیتر |
| سدیم دو دسیل سولفات ۲ درصد | ۲ میلی‌لیتر |
| آب مقطر | ۴/۶ میلی‌لیتر |

سلول‌ها پس از خرد شدن به ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند. ویال‌ها بعد از ۶۰ دقیقه نگهداری روی بن‌ماری با دمای ۶۰ درجۀ سلسیوس، به مدت ۵ دقیقه با شتاب ۱۲۰۰۰۰ متر بر مجذور ثانیه سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت یا مایع رویی به ویال‌های دیگر منتقل و هم‌حجم آن کلروفرم- ایزوآمیل الکل با نسبت‌های ۱:۲۴ اضافه و به آرامی تکان داده شد. دو فاز تشکیل شده در مرحلۀ قبل، با استفاده از سانتریفیوژ با شتاب ۱۲۰۰۰۰ متر بر مجذور ثانیه به مدت ۵ دقیقه، جداسازی و با برداشتن لایۀ رویی و انتقال به تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری دیگر، ۰/۵ میکرولیتر RNAase به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجۀ سلسیوس در بن ماری قرار داده شد. بعد از ۳۰ دقیقه، ویال‌ها برداشته شدند و هم حجم آن‌ها ایزوپروپانول اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجۀ سلسیوس قرار داده شد. با سانتریفیوژ با شتاب ۱۲۰۰۰۰متر بر مجذور ثانیه، DNA ترسیب و با قرار دادن ویال‌ها در دمای اتاق، DNA خشک گردید. در پایان، DNA خشک شده در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل گردید. برای آگاهی از کیفیت و کمیت استخراج DNA، ۵ میکرولیتر از DNA حل شده در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه، با استفاده از ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید و در همۀ نمونه‌ها DNA ژنومی با کیفیت و غلظت خوب مشاهده شد.

**واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1] و تکثیر قطعه 16s rDNA**

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر، با اجزای جدول ۴ و استفاده از پرایمرهای طراحی شده در سطح جنس برای ایزوله‌ها انجام گرفت. توالی آغازگرهای اختصاصی به کار رفته برای تکثیر ژن لاکتوباسیلوس‌ها (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') HaIF (5' AAGGTTACCTCACCGACTTC 3') HaIR و توالی آغازگر مورد استفاده برای تکثیر ژن *انتروکوکوس*، *لاکتوکوکوس*، *پدیوکوکوس* و *لوکونوستوک* (5' CTAATACATGCAAGTCGAACG 3') EF (5' CTAGTACCAAGGCATTCACC 3') ER بوده است (Darke *et al.*, 1996).

**جدول ٤- حجم اجزای تشکیل دهندۀ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز**

| مواد تشکیل دهنده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز | حجم (میکرولیتر) |
|---|---|
| Master | ۱۳ |
| $dH_2O$ | ۱۰ |
| Primer forward / reverse | ۰/۵ |
| DNA | ۱ |

1- Polymerase Chain Reaction (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با چرخه‌های واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه با مرحلهٔ واسرشته‌سازی در ۹۴ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحلهٔ اتصال آغازگر در دمای ۵۷ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و یک چرخهٔ بسط نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

**تفکیک قطعات تکثیر یافته**

برای تفکیک قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. بدین ترتیب که نمونه‌های تکثیر یافته به نسبت ۶ به ۱ با بافر بارگذاری (جدول ۵) مخلوط و در چاهک‌های ژل (جدول ۶) بارگذاری شدند.

**جدول ۵- غلظت مواد مورد نیاز برای تهیه بافر بارگذاری 6X**

| نام ترکیب | غلظت |
|---|---|
| Bromophenol blue | ۰/۰۹ درصد وزنی- حجمی |
| Xylene cyanolff | ۰/۰۹ درصد وزنی- حجمی |
| Glycerol | ۶۰ درصد وزنی- حجمی |
| EDTA | ۶۰ میلی مولار |

**جدول شمارهٔ ٦- غلظت محلول‌های مورد نیاز برای الکتروفورز ژل آگارز (TAE 50 x)**

| نام ترکیب | غلظت |
|---|---|
| Tris base | ۲۴۳ گرم در لیتر |
| EDTA pH=8 | ۵۰ میلی مولار |
| Glasial acetic acid | ۷۱ درصد (حجمی- حجمی) |

پس از اتمام الکتروفورز، ژل مورد نظر با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و نوارهای تکثیر یافتهٔ DNA در همهٔ نمونه‌ها به صورت تک نوار و با اندازهٔ تقریبی ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید و با غلظت‌های مناسب با استفاده از نور UV مشاهده و عکس‌برداری شد.

**شناسایی در حد گونه**

برای شناسایی جدایه‌ها در حد گونه لازم است آزمون‌های هیدرولیز آرژینین، رشد در دماهای مختلف و تخمیر کربوهیدرات اجرا شود (Walter & Hertel, 2009).

آزمون رشد در دماهای مختلف با تلقیح در محیط MRS براث و گرم‌خانه گذاری به مدت ۳ روز در دماهای ۱۵ و ۳۰ درجهٔ سلسیوس انجام شد.

آزمون هیدرولیز آرژینین برای ارزیابی کوکوس‌ها در محیط آرژینین براث و برای ارزیابی لاکتوباسیل‌ها، آزمون هیدرولیز آرژینین در محیط MRS براث حاوی آرژینین اجرا شد. برای تشخیص تولید گاز آمونیاک، معرف نسلر[1] به کار رفت. تغییر رنگ سریع به نارنجی نشانهٔ تولید آمونیاک و تغییر نیافتن رنگ نشانهٔ هیدرولیز نشدن آرژینین در نظر گرفته شد (Walter & Hertel, 2009).

**آزمون تخمیر کربوهیدرات‌ها**

برای شناسایی کامل‌تر باکتری‌های جداسازی شده، واکنش تخمیر کربوهیدرات‌ها صورت گرفت. در این

1- Nessler Reagent

آزمون، محلول ۲ درصد از کربوهیدرات‌های مورد نظر (شامل آرابینوز، اسکولین، فروکتوز، گلوکز، لاکتوز، مالتوز، مانوز، ملی‌بیوز، رافینوز، رامنوز، ریبوز، سالیسین، ترهالوز، زایلوز) در محیط کشت پایه تهیه شدند.

## نتایج و بحث

### نتایج حاصل از شمارش جمعیت میکروبی

نتایج حاصل از نمونه‌برداری و کشت در محیط‌های کشت مختلف در جدول ۷ تنظیم شده است.

**جدول ۷- میانگین جمعیت میکروبی شمارش شده از هر محیط کشت در پنیر کوزه رسیده**

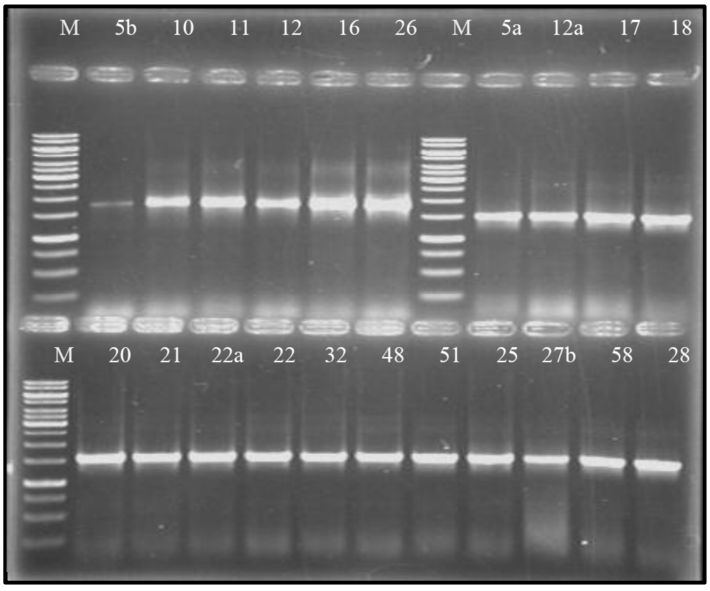
| محیط کشت | میانگین جمعیت میکروبی (کلنی در گرم) |
|---|---|
| MRS | $۷/۸ \times ۱۰^{۶}$ |
| M17 | $۸/۸ \times ۱۰^{۶}$ |
| KAA | $۲/۲ \times ۱۰^{۶}$ |
| Rogosa | $۲/۹ \times ۱۰^{۷}$ |
| MRS + vancomycin | $۳/۴ \times ۱۰^{۴}$ |

### نتایج آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

پروفایل به دست آمده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در شکل ۲ نشان داده شده است.

طبق نتایج آزمون واکنش زنجیرهٔ پلیمراز، ژن جدایه‌های 5b، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۶ و ۲۶ که با آغازگر انتروکوکسی تکثیر شده بودند، به عنوان جدایه‌های متعلق به گونه‌های *انتروکوکوس*، *لاکتوکوکوس*، *پدیوکوکوس* یا *لوکونوستوک* تشخیص داده شدند.

همچنین ژن‌های جدایه‌های شماره 5a، 12a، ۱۷، ۱۸، ۲۰، ۲۱، ۲۲، 22a، ۲۵، 27b، ۲۸، ۳۲، ۴۸، ۵۱ و ۵۸ که با استفاده از آغازگر لاکتوباسیلوس تکثیر شده بودند، به عنوان جدایه‌های متعلق به جنس *لاکتوباسیلوس* تشخیص داده شدند.




**شکل ۲- پروفایل حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جدایه‌های باکتری‌های لاکتیکی به دست آمده از پنیر کوزه پس از ۹۰ روز دورهٔ رسیدن**

به علاوه، با مقایسهٔ نتایج به دست آمده از آزمون‌های بیوشیمیایی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی جدایه‌ها، صحت آزمون‌های بیوشیمیایی تایید شد.

نتایج حاصل از شناسایی باکتری‌های لاکتیکی موجود در پنیر کوزه رسیده در جدول ۸ خلاصه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بیشترین جمعیت میکروبی شمارش شده در پنیر کوزه، به جنس *لاکتوباسیلوس* (۳۷/۳ درصد)، *انتروکوکوس* (۲۵/۵ درصد) و *لاکتوکوکوس* (۱۹/۶ درصد) تعلق دارد. جنس‌های *پدیوکوکوس* و *لوکونوستوک* به میزان کمتری (به ترتیب ۹/۸ درصد و ۷/۸ درصد) یافت شدند.

**جدول ۸- تعداد جنس‌های باکتری‌های لاکتیکی جداسازی شده در پنیر کوزه**

| جنس باکتریایی | تعداد | درصد |
|---|---|---|
| *انتروکوکوس* | ۱۳ | ۲۵/۵ |
| *لاکتوکوکوس* | ۱۰ | ۱۹/۶ |
| *لاکتوباسیلوس* | ۱۹ | ۳۷/۳ |
| *لوکونوستوک* | ۵ | ۷/۸ |
| *پدیوکوکوس* | ۴ | ۹/۸ |

ثابت شده است که رشد لاکتوباسیلی در pH پایین، بیشتر از سایر جنس‌های لاکتیکی است (Caridi, 2003). ولی لاکتوکوکسی و لوکونوستوک به دلیل این‌که تحمل کننده شرایط اسیدی[1] هستند به میزان کمتری رشد می‌کنند (Garcia- Fontan *et al.*, 2001). این امر با یافته‌های محققان مطابقت دارد که در پایان دورهٔ رسیدن انواع پنیرها (مخصوصاً پنیرهایی که دورهٔ رسیدن طولانی‌تری دارند)، لاکتوباسیل‌ها درصد بالایی از جمعیت میکروبی غالب را تشکیل می‌دهند (Fortina *et al.*, 2003; Gurses & Erdugan, 2006). علت این پدیده ممکن است مربوط به پیشرفت فرآیند پروتئولیز و تشدید آن در پایان دورهٔ رسیدن پنیر باشد. در این مرحله، مقدار پپتیدها و اسیدهای آمینه‌ای لازم برای رشد و تکثیر لاکتوباسیل‌ها، افزایش می‌یابد. از این رو، دورهٔ انتهایی رسیدن پنیر محیط بسیار مناسبی برای تکثیر و رشد لاکتوباسیل‌ها فراهم می‌شود (Crow *et al.*, 1995).

با توجه به pH پایین این نوع پنیر (برابر ۵/۳ تا ۵/۱) (Meshgi-Agazadeh, 2006)، و پنیرهای مشابه از جمله پنیر تولوم (۵/۲ تا ۴/۲)، رشد بیشتر باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* در کنار رشد ضعیف‌تر باکتری‌های *لاکتوکوکوس* و *لوکونوستوک* منطقی به نظر می‌رسد.

**نتایج حاصل از شناسایی جدایه‌ها در حد گونه**

با توجه به جدول ۹ می‌توان دریافت که از بین ۵۱ جدایه مختلف از باکتری‌های لاکتیکی که در پنیر کوزه جداسازی و شناسایی شدند، *انتروکوکوس فیسیوم* (۱۶ درصد)، *لاکتوکوکوس لاکتیس* (۱۴ درصد)، *لوکونوستوک مزنتروئیدس* زیرگونهٔ *مزنتروئیدس* (۱۰ درصد)، *لاکتوباسیلوس کازئی* زیرگونهٔ *کازئی* (۸ درصد)، و *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیکی* (۸ درصد) عمده‌ترین گونه‌ها بودند.

در پاره‌ای از منابع علمی، به حضور غالب *انتروکوکوس فیسیوم* در پنیرهای مشابه مانند پنیر لیقوان و کوملِک[2] اشاره شده است

1- Aciduric
2- Comlek

(Bulut *et al.*, 2005; Navid-Ghasemizad *et al.*, 2009).

بسیاری از سویه‌های *انتروکوکوس فیسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* جداسازی شده از محصولات شیری، تولیدکنندگان خوبی برای استالدئید، اتانول، دی‌استیل و استوئین هستند. این باکتری‌ها وقتی در شیر رشد می‌کنند، باعث توسعه رایحه و طعم در پنیر می‌شوند. به نظر می‌رسد این گونه‌ها پتانسیل متابولیکی برای گسترش طعم در محصولات شیری تخمیری دارند (Girrafa, 2003).

در پنیر رسیده که ۳ ماه از دورهٔ رسیدن را طی کرده بود، *انتروکوکوس فاسیوم*، *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونهٔ *لاکتیس*، *لاکتوباسیلوس کازئی* زیرگونهٔ *کازئی*، *انتروکوکوس فکالیس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونهٔ *لاکتیس* به میزان بیشتری جداسازی شدند. این باکتری‌ها با توجه به تحقیقاتی که در گذشته دربارهٔ خواص پروتئولیتیک و لیپولیتیک آن‌ها انجام شده، می‌توانند تأثیر ویژه‌ای روی عطر و طعم پنیر نهایی داشته باشند.

حضور *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* در انواع پنیر با درصد بالای نمک مانند لیقوان گزارش شده است (Navid-Ghasemizad *et al.*, 2009).

**جدول ۹- تعداد جدایه‌های لاکتیکی جداسازی شده در پنیر کوزه**

| نام باکتری | تعداد |
|---|---|
| *انتروکوکوس دورانس* | ۲ |
| *انتروکوکوس فکالیس* | ۳ |
| *انتروکوکوس فیسیوم* | ۸ |
| *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیکی* | ۴ |
| *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* | ۲ |
| *لاکتوباسیلوس برویس* | ۱ |
| *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* | ۱ |
| *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونهٔ *دلبروکی* | ۲ |
| *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونهٔ *لاکتیس* | ۳ |
| *لاکتوباسیلوس شارپه* | ۲ |
| *لاکتوباسیلوس فارسیمینیس* | ۱ |
| *لاکتوباسیلوس کازئی* زیرگونهٔ *کازئی* | ۴ |
| *لاکتوباسیلوس گازری* | ۱ |
| *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* | ۲ |
| *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونهٔ *دی‌استی‌لاکتیس* | ۳ |
| *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونهٔ *لاکتیس* | ۷ |
| *لوکونوستوک مزنتروئیدس* زیرگونهٔ *مزنتروئیدس* | ۵ |

در سایر پنیرهای سنتی تهیه شده از شیر گوسفند نیز نتایج مشابهی گزارش شده است. برای مثال، در پنیر فیوره ساردو[1] که یک پنیر سنتی ایتالیایی تهیه شده از شیر خام گوسفند است، لاکتوباسیل‌های ناهمسان تخمیر اختیاری، مثل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس*

1- Fiore Sardo

*پنتاسوس*، در فاز رسیدن غالب بودند (Mangia *et al.*, 2008).

اورتیگوسا و همکاران (Ortigosa *et al.*, 2006) می‌گویند سطح بالای لاکتوباسیل‌های ناهمسان تخمیر به دست آمده در پنیرهای تهیه شده از شیر خام، اهمیت این گروه باکتری‌ها را طی رسیدن تأیید می‌کند و ممکن است این باکتری‌ها در خصوصیات طعمی پنیر اثر داشته باشند. این دو گونه ممکن است فعالیت پروتئولیتیک و لیپولیتیک بالایی داشته باشند و در فرآیند رسیدن پنیر نقش بسیار مهمی ایفا کنند.

## نتیجه‌گیری

با توجه به این‌که جدایه‌های *انتروکوکوس فیسیوم*، *انتروکوکوس فکالیس*، *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونهٔ *لاکتیس* در پنیر کوزه بیشتر از دیگر جدایه‌ها بوده‌اند، منطقی است گفته شود که این باکتری‌ها بیشترین مشارکت را در رسیدن این پنیر نیز دارند. لذا در تولید صنعتی این پنیر یا حتی برای تولید پنیر جدید با عطر و طعم مشابه با پنیر کوزه، می‌توان از این جدایه‌ها به عنوان مایهٔ آغازگر استفاده کرد.

## قدردانی

از اعضا هیات علمی و کارشناسان مرکز تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی کرج به دلیل تأمین امکانات و هزینه‌های اجرای این پژوهش تشکر می‌شود.

## مراجع

Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brenan, N. and Cogan, T. M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. Int. Dairy J. 11, 259-274.

Buffa, M., Guamis, B., Pavia, M. and Trujillo, A. J. 2001. Lipolysis in cheese made from raw, pasteurized or high pressure treated goat's milk. Int. Dairy J. 11(3): 175-179.

Bulut, C., Gunes, H., Okuklu, B., Harsa, S., Kilic, S., Coban, H. S. and Yenidunya, A. F. 2005. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. J. Dairy Res. 72, 19-24.

Caridi, A. 2003. Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from the artisanal bovine cheese Pecorino del Poro. Int. Dairy Tech. 56, 105-110.

Crow, V. L., Coolbar, T., Gopal. P. K., Mertley, F. G., McKay, L. L. and Ripe, H. 1995. The role of autolysis of lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 5, 855-875.

Darke, M., Small, C. L., Spence, K. D. and Swanson, B. G. 1996. Rapid detection and identification of *Lactobacillus* sp. in dairy products by polymerase chain reaction. J. Food Protect. 59, 1031-1036.

Farajnia, S. 2009. Isolation and determination of functional properties of two lactobacilli species in traditional Ligvan cheese. Proceeding of the18th National Congress of Food Science and Technology. Oct. 15-16. Food Science and Technology Institute of Khorasane Razavi. Mashahd. Iran. 1-6 (in Farsi)

Fernandez-Garcia, E., Gaya, P., Medina, M. and Nunez, M. 2004. Evolution of volatile compounds of raw ewe's milk Castellao cheese: Seasonal variation. Int. Dairy J. 14, 39-46.

Fortina, M. G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A. and Manachini, P. L. 2003. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin PDO Italian cheese, the Tomapiemontese. Food Microbiol. 20, 397-404.

Fox, P. F., Guinee, T. P. and McSweeney, P. L. H. 2000. Fundamental of Cheese Science. Aspen Pub. Gaithersburg. M. D.

Garcia-Fontan, M. C., Franco, I., Prieto, B., Tornadijo, M. E. and Carballo, J. 2001. Microbiological changes in San Simon cheese throughout ripening and its relationship with physicochemical parameters. Food Microbiol. 18, 25-33.

Girrafa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. Int. J. Food Microbiol. 88, 215-222.

Gurses. M. and Erdogana, A. 2006. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tulum cheese during ripening period. Int. J. Food Prop. 9(3): 551-557.

Harrigan, W. F. 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology. 3rd Edition. Academic Press.

Hesami-Rad, R. 2006. Determination of chemical ingredients in Pot cheeses. Research Report. West Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center. (in Farsi)

Kamber, U. 2008. The traditional cheeses of Turkey: Cheeses common to all regions. Food Rev. Int. 2, 1-38.

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 Microbiol. 17, 23-32.

Mangia, N. P., Murgia, M. A., Garou, G., Sanna, M. G. and Deiana. P. 2008. Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. Food Microbiol. 25, 366-377.

Meshgi-Agazadeh, M. 2006. Evaluation of microbiological and chemical characters of Azerbaijan Pot cheese. J. Food Sci. Nutr. 4(3): 80-87. (in Farsi)

Mortazavi, S. A., Ghodse-Roohani, M. and Jooiandeh, H. 2005. Technology of Milk and Dairy Products. Ferdousi University Pub. Mashhad. Iran. (in Farsi)

Navid-Ghasemizad, 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. Int. J. Dairy Technol. 62, 260-264.

Oksuztepe, G., Patir B. and Calicioglu, M. 2005. Identification and distribution of lactic acid bacteria during the ripening of Savak Tulum cheese. J. Vet. Anim. Sci. 29, 873-879.

Ortigosa, M., Arizcun, C., Irigoyen, A., Oneca, M. and Torre, P. 2006. Effect of lactobacillus adjunct cultures on the microbiological and physicochemical characteristics of Roncal-type ewe's milk cheese. J. Food Microbiol. 23, 591-598.

Salminen, S. and Von Wright, A. 1998. Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects. CRC Press. New York.

Urabach, G. 1995. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. Int. Dairy J. 5, 877-903.

Walter, P. H. and Hertel, C. 2009. Genus Lactobacillus. In: Sneath, P. H. (Ed.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3: The Firmicutes. Williams and Wilkins. Baltimore. 465-510.

AERI JAER *Journal of Agricultural Engineering Research/Vol.14/No.3/2013/P:83-96*

# Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria in Traditional Pot Cheese

**M. Ghaderi*, A. Azizi, H. Ezzatpanah, M. A. Hejazi and A. H. Hemmasi**

* Corresponding Author: M. Sc. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Email: mostafa.ghaderi64@gmail.com
Received: 3 April 2012, Accepted: 4 May 2013

Pot cheese is a traditional cheese that is preferred for its characteristic aroma and flavor. This type of cheese is made without added starter cultures; the native lactic flora contribute to the ripening and development of the typical aroma and flavor of this cheese. It is essential to identify the type of lactic acid bacteria involved in the ripening process. In this study, pot cheese was made traditionally and then ripened in underground stroage for three months. Lactic acid bacteria were isolated and identified in the ripened cheese. Identification of isolates at the species level was performed using phenotypic and 16s rDNA methods. Overall, 51 strains were isolated; the dominant genera were *Lactobacilli* (37.3%) and *Enterococci* (25.5%). Other species belonged to *Lactococci* (19.6%), *Leuconostoc* (9.8%) and *Pediococci* (7.8%). At the end of the ripening period, *Lactobacilli* dominated and the changes were significant. *Enterococci* and *Lactococci* showed significant changes during ripening, but significant changes were not found for *Pediococci* and *Leuconostoc*. The dominant isolated species was *Enterococcus faecium* (8 isolates), *Lactococcuslactis* ssp. *lactis* (7 isolates), *Lactobacilluscasei* ssp. *casei* (4 isolates) and *Pediococcusacidilactici* (4 isolates). These species are recommended for use as starter cultures in the manufacture of pot cheese or a new type of cheese with similar flavor.

**Keywords**: Cheese, Identification, Isolation, Lactic acid bacteria (LAB), Pot cheese