Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 6, No. 2, Summer, 2010, p. 145-148

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۹، ص. ۴۸-۱۴۵

مقاله کوتاه پژوهشی

شناسایی گونه های لاکتوباسیلوس هتروفرمنتاتیو اختیاری در پنیر لیقوان

معصومه قطبی[1*] صبیحه سلیمانیان زاد[2] محمود شیخ زین الدین[3]

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۱
تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۲۷

چکیده

باکتری های لاکتوباسیلوس هتروفرمنتاتیو اختیاری با شرکت در مکانیسم های بیوشیمیایی، عامل ایجاد خصوصیات منحصر به فرد عطری و طعمی در فراورده های لبنی سنتی از جمله پنیر لیقوان هستند. یکی از اهداف عمده ی شناسایی فلور میکروبی غیرآغازگر در فراورده های لبنی سنتی، ضمن حفظ ذخایر ژنتیکی بومی، تولید صنعتی فراورده هایی با ویژگی های عطری و طعمی مشابه فراورده های لبنی بومی است. بر اساس مطالعه انجام شده با استفاده از روش های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی برروی پنیر با دوره ماندگاری ۴ ماهه، باکتری های *Lb. plantarum*، *Lb. pentosus*، *Lb. paraplantarum*، *Lb. paracasei* و *Lb. casei* شناسایی شدند. گستردگی لاکتوباسیلوسهای هتروفرمنتاتیو در پنیر لیقوان با توجه به زمان رسیدگی متغیر بود.

واژه های کلیدی: پنیر لیقوان، *Lb. plantarum* و *Lb. casei*

مقدمه [1 2 3]

بدون شک یکی از کهن‌ترین فنون نگهداری فراورده‌های غذایی که بشر آن را فرا گرفته، تولید پنیر از شیر بوده است. پنیر مواد ته‌نشین شده‌ی مغذی مفید شیر می‌باشد که آب آن گرفته شده است. چهار جزء اصلی تشکیل دهنده‌ی انواع مختلف پنیر، شیر، مایه پنیر، میکروارگانیسم و نمک است. علت به وجود آمدن پنیر، دلمه شدن کازئین شیر در اثر تولید اسید توسط باکتریهای آغازگر می‌باشد (۵ و ۳). لاکتوباسیلوس های غیرآغازگری که در دوران رسیدگی پنیر طبیعی (بعد از یک الی سه ماه) جزو فلور میکروبی غالب آن می گردند غالباً از گروه هتروفرمنتاتیو اختیاری هستند که در اکثر مواقع تحت عنوان (FHL)[4] معرفی می شوند (۲). پکورینورامانو، فیورساردو و کانستراتوپوگلیز[5] سه مورد از مهم ترین پنیرهای سنتی ایتالیایی تهیه شده از شیر خام گوسفندی می باشند. کانگو و همکاران در سال ۲۰۰۳، ویژگی های میکروبی، عطری و طعمی و بیوشیمیایی سه نوع پنیر مذکور را بررسی کردند. در این پنیرها، بالاترین جمعیت میکروبی در طول ۱۲ ماه، مربوط به لاکتوباسیل های هتروفرمنتاتیو اختیاری بود (۴). منبع این دسته از باکتری‌ها در پنیرهای تهیه شده از شیر خام، فلور میکروبی شیر خام و آلودگی محیطی در حین دوشیدن شیر و تهیه‌ی پنیردر محل‌های مخصوص تولید آن بوده ولی در مورد پنیرهای تهیه شده از شیر پاستوریزه، ناشی از عدم کفایت فرایند پاستوریزاسیون در از بین بردن کامل باکتری ها و یا در اثر آلودگی محیطی بعد از پاستوریزاسیون شیر و در حین تولید پنیر در کارخانه‌ی لبنیات است. نقش عمده‌ی باکتری‌های اسید لاکتیک غیرآغازگر در طول دوران رسیدگی، توسعه ویژگی های عطری و طعمی منحصر به فرد انواع مختلف پنیرهاست (۳ و ۱۵). پنیر لیقوان که معمولاً از شیر خام گوسفند تهیه می‌شود، یکی از شناخته‌شده‌ترین پنیرهای سنتی ایران به حساب می‌آید که خاستگاه آن عمدتاً دهکده‌ی لیقوان در ۳۵ کیلومتری تبریز است. این پنیر جزو دسته‌ی پنیرهای آب نمکی نیمه‌سخت بوده و به دلیل تطابق با ذائقه بسیاری از مصرف‌کنندگان ایرانی از اهمیت بالایی برخوردار است (۱). با توجه به نقش بسیار مهم باکتری های لاکتوباسیلوس هتروفرمنتاتیو اختیاری در تولید ترکیبات

۱- عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس
(* نویسنده مسئول: Email: masoume_ghotbi@yahoo.com)
۲ و ۳- دانشیاران گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

4- Facultative Heterofermentative Lactobacilli (FHL)
5- Pecorino romano, Fiore sardo & Canestratopuglies

عطری و طعمی پنیرهای بومی در این مقاله حضور آنها بررسی می‌شود.

مواد و روش ها

نمونه برداری و کشت میکروبی

نمونه‌های پنیر یک کیلوگرمی سنتی لیقوان، حاصل از شیر خام گوسفند با دوره‌ی رسیدگی ۴ ماهه از ۸ بهر تولیدی، از واحد تولیدی اعتمادی در دهکده‌ی لیقوان خریداری شد. بعد از استریل‌کردن هر حلب پنیر و بازنمودن آن در شرایط اسپتیک، مجموعاً ۱۰گرم نمونه از سطح، مرکز و بخش تحتانی آن برداشته و به یک هاون استریل حاوی ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل منتقل گردید. نمونه در هاون کاملاً همگن شده و سپس محلول رویی به عنوان رقت 10^{-1} برای تهیه‌ی رقت‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-5} در لوله‌های حاوی ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. کلیه کشت‌ها در دو تکرار بر روی سوربیتول آگار (محیط کشت تقریباً اختصاصی، برای جداسازی لاکتوباسیلوسهای هتروفرمنتاتیو اختیاری) انجام پذیرفت. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد در انکوباتور حاوی CO_2 به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. برای نگهداری طولانی مدت، مقداری از محیط کشت باکتریایی به لوله‌های اپندرف حاوی محلول گلیسرول (V/V) ۵۰ درصد منتقل و بلافاصله در ازت مایع منجمد گردیدند. لوله‌های مذکور در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد به صورت منجمد نگهداری شدند (۱۰).

بررسی مورفولوژیکی

پس از پایان گرمخانه‌گذاری و ظاهر شدن پرگنه‌ها، ویژگی های ظاهری جدایه‌های باکتریایی شامل رنگ، قطر، محل قرارگرفتن (سطحی یا عمقی)، برآمدگی (صاف، محدب و مقعر) و شکل (کروی، بیضوی و چین خورده) بررسی شد و پرگنه‌های مشکوک به لاکتوباسیلوس بعد از انجام آزمایش های کاتالاز، گرم و قابلیت تشکیل اسپور بر روی محیط کشت MRS جامد به صورت تری سکتور کشت داده شدند و مجدداً در شرایط مذکور گرمخانه‌گذاری شدند. جدایه های کاملاً خالصی که در این مرحله حاصل گردید به صورت کشت شیبدار (اسلنت) تا زمان انجام آزمایش های بعدی در یخچال نگهداری شدند.

تعیین تخمیر همگن یا ناهمگن بودن

برای انجام این آزمایش تولید گاز از گلوکز و گلوکونات مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که باکتری مورد نظر در لوله آزمایش حاوی آبگوشت MRS و MRS-fermentation broth و لوله‌ی دورهام تلقیح شد و پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در طی ۷۲ ساعت، وجود یا عدم وجود گاز در لوله دورهام بررسی گردید. به طور همزمان رشد در دماهای ۱۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد نیز برای شناسایی جدایه‌های معتدل‌دوست (مزوفیل) و گرمادوست بررسی شد (۱۰).

آزمایش های بیوشیمیایی

توانایی جدایه‌های باکتریایی در تولید اسید از کربوهیدرات‌های آرابینوز، لاکتوز، مانیتول، ملی زیتوز، ملی بیوز، رافینوز، ریبوز، سوربیتول، زایلوز، رامنوز، تری هالوز و مانوز بر روی محیط کشت MRS fermentation broth ارزیابی شد (کلیه کشت‌ها در دو تکرار انجام شد) (۱۲).

نتایج و بحث

مشخصات ۷ عدد از جدایه‌های شاخص انتخابی در جدول ۱، آورده شده است.

جدول۱- ویژگی های ظاهری تعدادی از جدایه های انتخابی

محل تشکیل کلونی	شکل ظاهری	قطر تقریبی(mm)	رنگ	نام جدایه
مرکز	بی‌شکل	۳	سفید	A3
سطح	لوبیایی شکل	۴	سفید	A4
کف	بی‌شکل	۵	سفید	B4
نزدیک به سطح	عدسی شکل	۳	سفید	C2
نزدیک به سطح	دایره‌ای شکل	۳	سفید	C3
سطح	دایره‌ای شکل	۱/۵	سفید	C4
نزدیک به سطح	دایره‌ای شکل	۱	سفید	H5

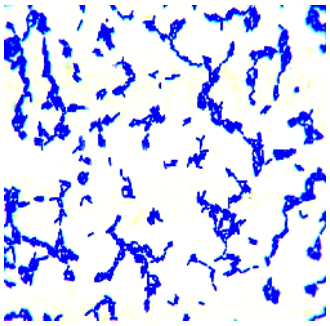
* حروف انگلیسی به کار برده شده در جدول مربوط به کد انتخابی جدایه‌های جداسازی‌شده از هر حلب پنیر مورد آزمایش است.

جدول۲ خصوصیات تخمیری تعدادی از جدایه‌های انتخابی

نام جدایه	ریبوز	تری هالوز	لاکتوز	رافینوز	رامنوز	مانیتول	ملی زیتوز	زایلوز	ملی بیوز	آرابینوز	مانوز
A3	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
A4	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
B4	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
C2	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
C3	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
C4	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
H5	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+

+ : واکنش مثبت - : واکنش منفی

بر اساس ویژگی های مورفولوژیکی مشخص گردید که، کلیه‌ی باکتری‌های میله‌ای شکل با آرایش سلولی متنوع،گرم مثبت (شکل۱)، کاتالاز منفی و غیراسپورزا به جنس لاکتوباسیلوس از خانواده اسید لاکتیک باکتری ها تعلق دارند (۱۲).



شکل ۱ تصویر جدایه های لاکتوباسیلوس

تمامی جدایه‌ها قادر به تولید گاز و اسید از گلوکونات و فاقد توانایی تولید گاز از گوکز بودند، بنابراین در دسته لاکتوباسیلوس‌های هتروفرمنتاتیو اختیاری قرار گرفتند. همچنین کلیه جدایه ها به دلیل رشد در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد و عدم رشد در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد، در دسته میکروارگانیسمهای مزوفیل قرار می‌گیرند.

بر اساس اطلاعات جدول برجی گونه‌های مربوط به گروه *Lb. plantarum* و *Lb. casei* بر اساس تخمیر قند ملی بیوز و رافینوز قابل تشخیص هستند (۱۲). به طوریکه احتمالاً جدایه‌های H5، C4 و A3 که قند ملی بیوز و رافینوز را تخمیرکرده‌اند به گروه *Lb. plantarum* و جدایه‌های C2، C3، B4 و A4 که قادر به تخمیر این دو قند نیستند به گروه *Lb. casei* تعلق دارند (جدول۲).

گروه *Lb. casei* بر اساس تقسیم بندی کولینز و همکاران در سال ۱۹۸۹ از سه گونه با نامهای *Lb. rhamnosus*، *Lb. paracasei* و *Lb. casei* تشکیل شده است (۹). میلر و همکاران بر اساس مطالعات هیبریداسیون DNA-DNA عنوان کرده‌اند که همولوژی کمی (۵۰٪) بین گونه‌های *Lb. casei* و *Lb. rhamnosus* و شباهت ژنتیکی بسیار بالا (۱۰۰٪ ۷۰) بین گونه‌های *Lb. paracasei* و *Lb. casei* وجود دارد (۶). در گروه *Lb. casei* کلیه ایزوله ها قند رامنوز را تخمیر نکرده‌اند، بنابراین با توجه به جدول برجی (۱۲) به یکی از دو گونه‌ی *Lb. paracasei* و *Lb. casei* تعلق دارند که شناسایی آنها در سطح گونه منوط به انجام آزمایش های مولکولی معتبر بر اساس آغازگرهای اختصاصی هر گونه است (۷ و ۱۴). دلاگلیو و همکارن بر اساس هیبریداسیون DNA-DNA، وابستگی DNA گونه‌های *لاکتوباسیلوس* زیر جنس *Sterptobacterium* را که توسط ارلا جنسن طبقه‌بندی شده بودند مشخص کردند. بر اساس بررسی انجام شده توسط آنها مشخص گردید که گروه *L. plantarum* دارای سویه‌هایی است که علی‌رغم دارا بودن ویژگی های بیوشیمیایی یکسان، تشابه ژنتیکی کمی دارند در نتیجه این گروه به سه گونه‌ی مجزا به نام‌های *L. plantarum*، *L. pentosus* و *L. paraplantarum* تقسیم گردید که به دلیل شباهت بسیار زیاد فنوتیپی به کارگیری آزمایش های مولکولی برای شناسایی اعضای این گروه پیشنهاد می‌شود (۶).

باکتری‌های لاکتوباسیلوس هتروفرمنتاتیو اختیاری به خصوص گونه های گروه *Lb. plantarum* و *Lb. casei*، از جمله فراوان‌ترین لاکتوباسیل های جدا شده از پنیرهای گاوی و گوسفندی رسیده مختلف هستند. به عنوان مثال در پنیر فیورساردو با دوره ماندگاری ۳ ماهه، که از شیر خام گوسفند تهیه می‌شود، بر اساس تحقیقات انجام شده مشخص گردید که گونه‌های لاکتوباسیلوس هتروفرمنتاتیو اختیاری، به عنوان فلور میکروبی غالب، خصوصیات عطری وطعمی منحصر به فردی ایجاد می‌کنند (۱۰). این دسته از میکروارگانیسم‌ها علی‌رغم شرایط نامساعد درون پنیرهای رسیده مانند pH پایین، عدم وجود کربوهیدرات قابل تخمیر، غلظت بالای نمک، کمبود اکسیژن و وجود ترکیبات ضد میکروبی (احتمالاً باکتریوسینهایی که توسط باکتری‌های اسید لاکتیک آغازگر تولید می‌شوند) به دلیل فعالیت پپتیدازی بسیار بالای خود نسبت به باکتری‌های‌آغازگر و همچنین با انجام هیدرولیز ثانویه، در چنین محیط‌هایی ترکیبات عطری و طعمی کم نظیری تولید می‌کنند (۸).

در مورد نقش لاکتوباسیل های مزوفیل در تولید ترکیبات عطری و طعمی پنیرهای سنتی تحقیقات گسترده ای انجام شده است. به عنوان مثال در پنیر فُسا باکتریهای *Lb paracasei* subsp *paracasei*، *Lb plantarum* و *Lb curvatus* با تولید پپتیدهای

کوچک و اسیدهای‌آمینه فرار ترکیبات عطری و طعمی از طریق فعالیت‌های دی‌پپتیداز، آمینوپپتیداز [(Leu-P-NA)] و [(Glu-P-NA)]، اندوپپتیداز و پروتئیناز خود عطر و طعم بسیار مطلوبی ایجاد می نمایند. با بررسی پروفیل اسیدهای چرب در پنیر فُسای تهیه شده از شیر خام گوسفند، مشخص گردید که میزان اسیدهای چرب فرار (اسید بوتیریک ($C_۴$)، اسید کاپروئیک ($C_۶$)، اسید کاپریلیک ($C_۸$)، اسید کاپریک ($C_{۱۰}$)، اسید پالمیتیک ($C_{۱۶}$)، اسید استئاریک ($C_{۱۸}$)، اسید لینولئیک ($C_{۱۸:۳}$) و اسید لینولنیک ($C_{۱۸:۲}$)) به مراتب بیشتر از پنیر تهیه شده از شیر گاو (که اسید اولئیک ($C_{۱۸:۱}$) بالایی دارند) است (۸). در پنیرهای ایتالیایی یکساله با بررسی میزان اسیدهای‌آمینه فرار توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مشخص گردید که میزان اسیدهای‌آمینه اسید گلوتامیک، هیستیدین، والین، ایزولوسین، لوسین و فنیل‌آلانین نسبت به سایر اسیدهای‌آمینه بالاتر است. در این پنیرها لاکتوباسیلوسهای مزوفیل، به عنوان فلور میکروبی غالب، با فعالیت پروتئین‌کافتی بسیار بالای خود، عطر و طعم کم نظیری ایجاد می‌کنند (۴). در بررسی انجام شده بر روی یک نوع پنیر هلندی مشخص گردید که سلولهای فاز سکون *Lb. plantarum* و *Lb. casei* در دوران رسیدگی پنیر، سیترات (در نبود منابع انرژی قابل مصرف توسط آنها) را به $CO_۲$، استات، استوئین، دی استیل و ۲و۳ بوتاندیول تبدیل می‌کنند. در این پنیر دی‌اکسیدکربن در ایجاد چشم (خلل و فرج) و سایر ترکیبات در بهبود عطر و طعم نقش معنی‌داری دارند (۱۱).

نتیجه گیری

اطلاعات مشابهی در زمینه تأثیر فلور میکروبی بر خصوصیات عطری و طعمی پنیر لیقوان وجود ندارد ولی به نظر می رسد که این پنیر نیز مانند سایر پنیرهای تهیه شده از شیر خام گوسفند، عطر و طعم استثنایی خود را مدیون فعالیت های پروتئین کافتی و چربی کافتی بسیار بالای باکتری های اسید لاکتیک مزوفیل به ویژه *Lb. plantarum* و *Lb. casei* می باشد.

منابع

۱- کوزیکووسکی، ف. ۱۳۷۴. پنیر و فراورده های شیری تخمیری، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات:۵۸ تا ۱۰۴.

۲- عبدی، ر.، ۱۳۸۴. ردیابی باکتری‌های لاکتیک در پنیر لیقوان بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده کشاورزی، صفحات:۳۶ ۲۵.

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

4- Cagno, D.R., J. Banks, L. Sheehan, F.P. Fox, Y.E. Brechany, A. Corsetti and M. Gobbetti. 2003. Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewe's milk cheeses. *Int. Dairy J*. 13: 961-972.

5- Davies, F., 1984. Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk, William and Wilkins Publishers, Baltimore, pp, 80-96.

6- Dellaglio, F., V. Bottazzi and M. Vescovo. 1975. Deoxyribonucleic Acid Homology Among *Lactobacillus* Species of the Subgenus Streptobacterium Orla-Jensen. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 25: 160-172.

7- Dellaglio, F., E.G. Felis and S. Torriani. 2002. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and Lactobacillus paracasei Collins et al., 1989, Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 52: 285-287.

8- Gobbetti, M., B. Folkertsma, F.P. Fox, A. Corestti and E. Smacchi. 1999. Microbiology and biochemistry of Fossa (pit) cheese. *Int. Dairy J*. 9: 763-773.

9- Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte and G. Reuter. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol*. 41: 103-125.

10- Mannu, L., R. Comunian and F.M. Scintu. 2000. Mesophillic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. *Int. Dairy J*. 10: 383-389.

11- Palles, T., T. Beresford, S. Condon and M.T. Cogan. 1998. Citrate metabolism in *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol*. 85: 147-154.

12- Peter, H. and A. Sneath. 1996. Berjey's manual of systematic Bacteriology, 2th ed., United Stated of America, pp, 1066-1234.

13- Peterson, S.D. and R.T. Marshall. 1990. Non starter lactobacilli in chedar cheese: A review. *J. Dairy Sci*. 73: 1395-1410.

14- Walter, J., W.G. Tannock, T.A. Timisjarvi, S. Rodtong, M.D. Loach, K. Munro and T. Alatossava. 2000. Detection and Identification of Gastrointestinal *Lactobacillus* Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers. *Appl. Environ. Microbiol*. 66: 297-303.

15- Wouters, M.T.J., E.H.E. Ayad, J. Hugenholtz and G. Smit. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J*. 12: 91-109.