جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جداسازی و شناسایی سویه‌های انتروکوکسی غالب در پنیر سنتی لیقوان

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

تاریخ پذیرش: 87/12/12

1-دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
2- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
3- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
4- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
* مسئول مکاتبه E-mail: Jhesari@tabrizu.ac.ir

چکیده

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

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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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

H Rasouli Pirouzian[1], J Hesari[2*], S Farajnia[3], M Moghaddam[4] and Sh Ghiassifar[2]

[1]Former MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3]Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[4]Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
*Corresponding author: E-mail: Jhesari@tabrizu.ac.ir

Abstract

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

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

مقدمه

باکتری های جنس انتروکوکوس ارگانیسم هایی گرم مثبت، کاتالاز منفی، تخم مرغی شکل و غیر اسپورزا، بی هوازی اختیاری و هموفرمانتاتیو با احتیاجات غذایی پیچیده هستند (هیوکی 1998) که اغلب در اکثر سبزیجات، گیاهان و مواد غذایی به ویژه غذاهای با منشاء حیوانی مانند محصولات لبنی حضور دارند. آنها هم چنین قسمتی از فلور میکروبی طبیعی روده بعضی از پستانداران و انسان را تشکیل می دهند (گیرافا 2003). تعداد قابل توجهی از سویه های متعلق به گونه های متفاوت جنس انتروکوکوس دارای خواص بیولوژیکی یکسان مانند تولید باکتریوسین و رفتارهای پروبیوتیکی هستند. چنین باکتری هایی قادرند که

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

به صورت کلونی های تورفته از بقیه متمایز شوند و به دلیل داشتن مقاومت بالا توانایی رشد در محیط خارج روده ای نیز دارند. از این رو در خاک، آب های سطحی، روی گیاهان و سبزیجات هم مشاهده شده اند (گیرافا 2002) و می توانند در محیط های هیپوتونیک، هیپرتونیک، اسیدی و قلیایی رشد کنند (هیوکی 1998). دوام انتروکوکوس در طی رسیدن پنیر می تواند به محدوده وسیع رشد در دماهای مختلف 10-45 °C و اسیدیته (pH = 4-9/6) و به تحمل نمک (با غلظت 5/ 6 درصد NaCl) نسبت داده شود (اوگیر و سرور 2007).

انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس دورانس گونه هایی هستند که بیشترین فراوانی را در بین سایر گونه ها به خود اختصاص داده اند و به طور فراوان در محصولات لبنی یافت می شوند. بنابراین می توانند نقش بسیار مهم در بافت و آرومای پنیر ایفا کنند (موراندی و همکاران 2006). انتروکوکوس به عنوان بخش مهمی از میکروفلور طبیعی بسیاری از فرآورده های لبنی تشخیص داده شده است و در بعضی از پنیرها، بر فلور لاکتوباسیل و لاکتوکوکسی غالب است (سوزی و همکاران 2000).

انتروکوکوس کاربردهای مهمی در صنعت لبنیات دارد و در تکوین خصوصیات ارگانولپتیکی در طی رسیدن بسیاری از پنیرها نقش ایفا می کند. هم چنین از آن به عنوان مولفه اصلی در محیط کشت استارتر استفاده می شود (گیرافا 2002). انتروکوکوس می تواند دارای فعالیت های پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی باشد و بنابراین می‌تواند نقش بسیار مهمی در رسیدن پنیر ایفا کند (فولکوی مورنو و همکاران 2006). سویه های انتروکوکوس فکالیس فعالیت لیپولیتیکی و پروتئولیتیکی بیشتری نسبت به سایر سویه ها دارند. این میکروارگانیسم ها در مواد غذایی در طی نگهداری، تولید مواد آنتی میکروبیال (اسید لاکتیک، اسید استیک، اتانول، دی اکسید کربن، دی استیل) می کنند (فولکوی مورنو و همکاران 2006).

سویه ای از انتروکوکوس به نام *E. faecium SF68* به عنوان پروبیوتیک در سوئیس استفاده شده است که اثر کلینیکی موثری در جلوگیری از اسهال دارد و در فرآیند درمان اسهال در کودکان موثر شناخته شده است. اخیرا کمیته نظارت بر مواد غذایی در انگلیس[1] استفاده از سویه *E. faecium K77D* را به عنوان استارتر محصولات لبنی تخمیری تایید نموده است (فولکوی مورنو و همکاران 2006).

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

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

[1] Advisory Committee on Novel Foods and Processes (ACNFP)

های لازم برای بررسی و تحقیق بر روی سویه های بومی موجود در محصولات سنتی کاملا احساس می گردد.

مواد و روش ها

در مرحله اول چهار نمونه پنیر سنتی لیقوان از چهار منطقه و کارگاه مختلف از روستای لیقوان واقع در جنوب شرقی استان آذربایجان شرقی با چهار تکرار (در روزهای متفاوت) تهیه شد. روش شناسایی باکتری های انتروکوکوس در این تحقیق مبتنی بر روش های فنوتیپی بود. با استفاده از روش های بیوشیمیایی، سوش های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم جداسازی و تعیین هویت شدند. برای جداسازی باکتری های انتروکوکوس از محیط کشت اختصاصی کانامایسین اسکولین آزید آگار[1] به عنوان مناسب ترین محیط کشت برای شناسایی استفاده به عمل آمد. در این محیط وجود کانامایسین به عنوان عامل انتخابی مد نظر قرار گرفت. انتروکوک ها با هیدرولیز اسکولین تولید گلوکز و اسکولتین می کنند که در حضور سیترات فریک رنگ قهوه ای ایجاد می شود.

برای رقیق کردن نمونه ها، 5 گرم نمونه پنیر مورد نظر توزین و سپس با 10 میلی لیتر بافر PBS[2] مخلوط شد و به مدت چند دقیقه مخلوط و یکنواخت گردید. سپس بقیه غلظت ها از محلول همگن حاصل در اپندورف های حاوی 900 مایکرولیتر PBS 0/1 درصد استریل تهیه شد. رقت های 10^{-1}، 10^{-2} و 10^{-3} در بافر PBS تهیه گردیدند. مقدار 300 میکرولیتر از هر رقت در یک پلیت کانامایسین اسکولین آگار پخش شد و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد گرما گذاری گردید. کلونی های رشد یافته در هر پلیت پس از سپری شدن مدت گرماخانه گذاری مورد شمارش قرار گرفتند. سپس پنج کلونی به صورت تصادفی از پلیت هایی که به طور متوسط 100-30 کلونی در آنها شمارش شده بود، برداشته شد و مجددا روی همان محیط کشت اختصاصی کانامایسین، سطحی کشت داده شدند (سوزی و همکاران 2000).

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

برای شناسایی گونه های انتروکوکوس، واکنش تخمیر قندها برای تمامی جنس های جداسازی شده انجام گرفت. محیط کشت پایه مورد استفاده شامل لوریا براث LB[3] فاقد گلوکز و عصاره مخمر بود که به آن 0/01 درصد کروزل قرمز به عنوان شاخص تغییر pH افزوده شد. محلول 1 درصد قندهای مورد نظر در محیط کشت مزبور تهیه شد. سپس پارافین اضافه گردید تا تخمیر در شرایط کاملا بی هوازی صورت گیرد (لوپز دیاز و همکاران 2000).

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

[1]Kanamycin aesculin azide agar (Merck)
[2]Phosphate buffer saline
[3]Luria- Bertani media

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

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

همچنین برای مشخص نمودن مقاومت سویه‌های جداسازی شده به 10 نوع آنتی بیوتیک از آزمون آنتی بیوگرام استفاده گردید. بدین منظور محیط مولر هینتون[1] به کار برده شد. ابتدا سویه‌های انتروکوکوس در محیط لوریا براث LB کشت داده شده و غلظت کشت معادل 0/5 لوله‌های مک فارلند تنظیم گردید. سپس یک سواپ پنبه‌ای در محیط فوق غوطه‌ور گردیده و پس از گرفتن مایع اضافی بر روی محیط مولر هینتون به صورت یکنواخت پخش گردید. پس از جذب شدن رطوبت اضافی دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فاصله مناسب بر روی پلیت قرار داده شده و به مدت 18 ساعت گرماخانه گذاری انجام گردید. پس از مدت فوق قطر هاله‌ها اندازه‌گیری و مقاومت یا حساسیت بر اساس قطر هاله تعیین گردید (مایتی و همکاران 2007).

نتایج

آزمون کاتالاز

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

رنگ آمیزی گرم

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

واکنش تخمیر قندها

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

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

[1] Mueller-Hinton

جدول 1- نتیجه آزمون تخمیر قند برای پنیر شماره 1

نتیجه تعیین هویت	آرابینوز	ملی بیوز	رافینوز	سوربوز	سوربیتول	لاکتوز	
E. faecalis	+	-	-	-	+	+	سویه 1
E. faecalis	-	-	-	-	+	+	سویه 2
E. faecalis	+	-	-	-	+	+	سویه 3
E. faecalis	+	-	-	-	+	+	سویه 4
E. faecalis	+	-	-	-	+	+	سویه 5

جدول 2 - نتیجه آزمون تخمیر قند برای پنیر شماره 2

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

جدول 3 - نتیجه آزمون تخمیر قند برای پنیر شماره 3

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

آزمون تشکیل لخته

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

آزمون آنتی بیوگرام

نتایج آزمون آنتی بیوگرام نشان داد که تمامی سویه های انتروکوکوس جداسازی شده از چهار نوع پنیر لیقوان به آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین، نورفلوکساسین و نیتروفورانتوئین حساس بودند. 9 سویه انتروکوکوس به آنتی بیوتیک اریترومایسین و چهار سویه از نمونه پنیر سوم به آنتی بیوتیک تتراسایکلین مقاومت نشان دادند. همچنین برخی از سویه ها (7 سویه) به آنتی بیوتیک پنی سیلین مقاوم بودند. بعلاوه هیچ کدام از سویه ها به کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین، ریفامپسین و وانکومایسین مقاومت نشان ندادند (جدول 5).

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

جدول 4 - نتیجه آزمون تخمیر قند برای پنیر شماره 4

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

جدول 5 - نتیجه آزمون آنتی بیوگرام برای 20 جداسازی شده از چهار نمونه پنیر لیقوان

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

S= Sensitive, R= Resistant, I= Intermidate

دیسک های آنتی بیوتیک مورد استفاده شامل:

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

جدول 6- تعیین حساسیت یا عدم حساسیت سویه های انتروکوکوس به انواع آنتی بیوتیک بر حسب قطر هاله

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

بحث

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

عوامل متعددی بر روی خواص ارگانولپتیک پنیر موثر هستند که از مهمترین آنها می توان به نوع شیر، کیفیت میکروبی آن، تکنولوژی مورد استفاده در تولید پنیر و شرایط رسیدن پنیر اشاره کرد. در عین حال، باکتری های لاکتیک نقش عمده و مهمی را در ایجاد ترکیبات مسئول بهبود عطر و طعم در پنیر بر عهده دارند، به طور کلی انتروکوکوس ها هم به عنوان آلوده کننده محیط و هم در نقش استارتر طبیعی که باعث تکوین خصوصیات ارگانولپتیکی پنیرهای کامل می شوند، مطرح هستند (ساران تینی پولوس و همکاران، 2002). انتروکوکوس عموما در شیر خام و محصولات لبنی حضور دارد، چرا که شیر یک منبع مطلوب و ایده ال برای رشد این ارگانیسم ها شناخته شده است. انتروکوکوس ها به طور قابل توجهی می توانند در لخته پنیر و پنیرهای رسیده نیز حضور داشته باشند. بسیاری از تحقیقات، وجود انتروکوکوس را در شیر پاستوریزه و فرا دما[1] و بقای آنها را در طی پروسه شیر تایید کرده اند (گاردینی و همکاران 2001).

مشخص شده است که حضور انتروکوکوس برای تکوین آرومای پنیر در بسیاری از کشورهای جنوبی اروپا ضروری می باشد. بسیاری از تحقیقات نشان داده است سویه های انتروکوکوس با منشا غذایی تاثیر مثبت روی رسیدگی پنیرهای سنتی دارند. نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که در پنیرهای سنتی لیقوان انتروکوک ها در مقادیر بالایی حضور دارند و از میان گونه های مختلف، گونه های انتروکوکوس فکالیس و فاسیوم، انتروکوک های غالب موجود در پنیر لیقوان را تشکیل می دهند. این نتایج با نتایج مطالعات ارائه شده از کشورهای مختلف هم خوانی دارد. اوگیر و سرور (2007) نشان دادند که در پنیرهای مدیترانه ای تعداد انتروکوکوس در لخته 10^4-10^6 CFU/g و در پنیر رسیده 10^5-10^7 CFU/g بود. همچنین هدف از انجام آزمون آنتی بیوگرام در مطالعه حاضر این بود که وضعیت مقاومت باکتری های انتروکوکوس را به انواع آنتی بیوتیک ها تعیین نمائیم.

در تحقیقی که توسط نوید قاسمی (1383) انجام شد مشخص شد که انتروکوکوس ها جمعیت غالب میکروبی شیر خام را به خود اختصاص داده اند. بنابراین، با احتمال زیاد تاثیر قابل توجهی روی خواص کیفی و ارگانولپتیکی پنیر حاصل از آن داشته اند. در ترکیب پنیر سه ماهه لیقوان، انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس وجود دارند که با توجه به خواص پروتئولیتیک و لیپولیتیکی، می توانند تاثیر ویژه ای روی خواص کیفی پنیر لیقوان بر جای

[1] UHT

بگذارند (نوید قاسمی زاد 1383). همچنین ساران تینی پولوس و همکاران (2001) نشان دادند که در پنیرهایی نظیر: سبریرو[1]، سرا[2]، تلیمه[3]، فتا[4]، کمته[5]، منچگو[6]، موزارلا[7] و کفالوتریک[8]، انتروکوکوس ها قسمت اعظم فلور میکروبی پنیر تازه دلمه شده را به خود اختصاص می دهد و در بعضی از موارد، میکروارگانیسم های برجسته و غالب در محصولات رسیده را شامل می شوند.

انتروکوکوس به عنوان بخش مهمی از میکروفلور طبیعی بسیاری از فرآورده های لبنی تشخیص داده شده و در بعضی از پنیرها، آنها بر فلور لاکتوباسیل و لاکتوکوکسی غالب هستند (سوزی و همکاران 2000). نتایج بعضی از تحقیقات نشان می دهد که میکروارگانیسم غالب در پنیر سبریرو، انتروکوکوس فکالیس است که فراوان ترین انتروکوکوس جداسازی شده از پنیر تازه ایتالیایی تهیه شده از شیر خام اسیدی است. این میکروارگانیسم در مراحل مختلف برای تسریع رسیدن و بهبود خصوصیات ارگانولپتیکی پنیرها و سایر محصولات تخمیری شیر استفاده می شود (سنتنو و همکاران 1999). در پنیر منچگو پنیر تهیه شده از شیر خام گوسفند، لاکتوکوکوس لاکتیس فلور غالب بوده و سپس انتروکوکوس، لویکونستوک، استرپتوکوکسی و میکروکوکسی فلور اعظم این پنیر را تشکیل می دهند (دال و همکاران 2000).

در مجموع می توان اظهار داشت که حضور انتروکوکوس در مقادیر بالا در پنیرهای مختلف، با کمک به بهبود ویژگی های ارگانولپتیکی مواد غذایی تخمیری و توانایی آنها در تولید باکتریوسین ها (انتروسین) عامل مهمی است که باید برای کاربرد آنها در تهیه مواد غذایی توسط فرآوری کننده ها مورد توجه قرار گیرد (فولکوی مورنو و همکاران 2006). این موضوع که حضور انتروکوکوس در پنیرهای رسیده منجر به توسعه آروما می شود یا نه، هنوز بحث برانگیز است. بعضی از محققان بر این باور هستند که مقادیر زیاد انتروکوکوس منجر به گندیدگی و ویژگی های نامطلوب در بعضی از پنیرها می شود. از طرف دیگر بسیاری از گزارش های دیگر اشاره به تاثیر مطلوب انتروکوکوس در تولید و کیفیت پنیر دارند (ساران تینی پولوس و همکاران 2002). بعلاوه تفاوت در برخی ویژگی های تکنولوژیکی (به ویژه فعالیت پروتئولیتیکی) می تواند منجر به انتخاب سویه های ویژه شود و بنابراین در کنار باکتری های لاکتیک اسید به عنوان استارتر در تولید پنیرهای سنتی مورد استفاده قرار گیرد. عدم وجود عوامل بیماریزایی و واگیر در سویه های وحشی انتروکوکوس فاسیوم نشان می دهد که آنها می توانند به عنوان استارترهای غیر سنتی برای ایجاد ویژگی های حسی و تضمین سلامت این پنیرها به کار برده شوند (ساودرا و همکاران 2003)

[1] Cebreiro
[2] Serra
[3] Teleme
[4] Feta
[5] Comte
[6] Manchego
[7] Mozzarella
[8] Kefalotyric

منابع مورد استفاده

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Morandi S, Brasca M, Andrighetto C, Lombardi A and Lodi R, 2006. Technological and molecular characterization of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. International Dairy Journal 16: 867-875.

Ogier JC and Serror P, 2007. Part VI: The *Enterococcus* genus. International Journal of Food Microbiology 2: 1-11.

Psoni L, Tzanetakis N and Litopoulou-Tzanetaki E, 2003. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. Food Microbiology 20: 575-582.

Saavedra L, Taranto MP, Sesma F and Valdez GF, 2003. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. International Journal of Food Microbiology 88: 241-245.

Sarantinopoulos P, Andrighetto C, Georgalaki MD, Rea MC, Lombardi A, Cogan TM, Kalantzopoulos G and Tsakalidou E, 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. International Dairy Journal 11: 621-647.

Sarantinopoulos P, Leroy F, Leontopoulou E, Georgalaki MD, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E and De Vuyst L, 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium FAIR-E 198* in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. International Journal of Food Microbiology 72: 125-136.

Suzzi G, Caruso M, Gardini F, Lombardi A, Vannini L, Guerzoni ME, Andrighetto C and Lanorte MT, 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (Semicotto caprino). Journal of Applied Microbiology 89: 267-274 .