جداسازی و شناسایی فلورلاکتیکی پنیر لیقوان از تولید تا رسیدن

محمد رضا عدالتیان[۱]، محمد باقر حبیبی نجفی[۲*]، سید علی مرتضوی[۳]، محمد رضا نصیری[۴]، محمد رضا باسامی[۵]، سید مجیدهاشمی[۶]

۱- استادیار،عضو هیات علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد، عضو هیات علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استاد، عضو هیات علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- دانشیار، عضو هیات علمی گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد
۵- استادیار، عضو هیات علمی دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد
۶- دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱/۲۳)

چکیده

دراین تحقیق، ده نمونه شیر، دلمه، پنیرتازه (یک روزه) و پنیر رسیده (۹۰ روزه) لیقوان به عنوان یکی از معروف ترین ومشهورترین پنیرهای حاصل از شیر خام گوسفند و فاقد استارتر جهت بررسی فلورلاکتیکی آن، مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت بررسی جنس های لاکتوباسیلوس از محیط MRS، لاکتوکوکوس ازمحیطM17، پدیوکوکوس از محیط MRS، لویکونوستوک از محیط MRS+vancomycin و انتروکوکوس ازمحیط کشت KAA استفاده شد. سویه های جدا شده به کمک رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز، مورفولوژی، رنگ و پیگمان کلونی، تولید گاز دی اکسیدکربن از گلوکز، رشد در دمای ۱۰و ۴۵ درجه سانتیگراد، رشد در غلظت نمک ۶/۵ درصد، رشد در۹/۶ =pH، هیدرولیز آرژنین و سیترات تا حد جنس شناسایی شدند. چند کلونی به صورت تصادفی از هر محیط کشت دارای بالاترین درجه رقت، انتخاب و با انجام تست های تکمیلی تائید شدند. جنس های انتروکوکوس(۳۳/۶۸٪)، لاکتوباسیلوس (۳۳/۶۸٪) و لاکتوکوکوس (۲۶/۳۱٪) به عنوان فراوان ترین جنس ها در تمام مراحل تولید شناسایی شدند. در نهایت با استفاده از آزمون تخمیرقند و کربوهیدرات با استفاده از کیت های API 50 CH وAPI 20 STREP جدایه های مورد نظر تا حد گونه و زیر گونه شناسایی شدند. در مجموع ۹۵ سویه در کل مراحل تولید جداسازی و شناسایی شدند. نتایج حاصل از سیستم های API، گونه های ذیل را در تمام مراحل تولید مشخص کرد. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* زیر گونه *پاراکازئی*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه *دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس فروکتیورنس*، *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس*، *انتروکوکوس فاسیوم*، *انتروکوکوس فکالیس*، *انتروکوکوس دورانس*، *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس*، *لویکونستوک لاکتیس* و *لویکونستوک مزنترویدیس*. تغییرات باکتریهای اسید لاکتیک الگویی را مشخص کرد به طوریکه لاکتوکوکسی ها و لاکتوباسیلوس ها در اولین مرحله غالب بودند و در مراحل پایان دوره رسیدن انتروکوکوس ها جایگزین شدند. فراوان ترین گونه ها در تمام مراحل تولید به ترتیب عبارت بودند از: *لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه لاکتیس*(۲۵/۲۶٪)، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*(۲۰٪)، *انتروکوکوس فاسیوم*(۱۵/۷۸٪) و *انتروکوکوس فکالیس*(۱۵/۷۸٪). بنابراین اینگونه به نظر می رسد که این گونه های غالب نقش مهمی را دررسیدگی و تولید پنیر لیقوان به عهده دارند و پتانسیل کاربرداین گونه ها در صنعت وجود دارد.

کلید واژگان: باکتری های اسید لاکتیک، پنیر لیقوان، مراحل تولید، پنیر شیر خام

*مسئول مکاتبات: habibi@ferdowsi.um.ac.ir

۱- مقدمه

تاثیر فلورلاکتیکی بر خواص حسی و فیزیکی پنیرهای حاصل از شیر خام مختلف مورد مطالعه وسیع در سطح جهان قرار گرفته است. هدف از اینگونه تحقیقات، بررسی پتانسیل و توانایی صنعتی کردن این محصولات سنتی است. تحقیق و بررسی در مورد باکتری های اسید لاکتیک پنیرهای حاصل از شیر خام ایران به ندرت صورت گرفته است [۱].
باکتریهای اسید لاکتیک که به عنوان کشت آغازگر (استارتر) به شیر اضافه می شوند یا به صورت ذاتی[1] و طبیعی در شیر وجود دارند، نقش مهمی را در طعم وعطر پنیر بازی می کنند. از سوی دیگر، برخی باکتریهای اسید لاکتیک مانند انتروکوکوس ها، به دلیل تولید باکتریوسین، می توانند از رشد باکتریهای پاتوژن ممانعت به عمل آورند. به همین دلیل این باکتریها از دیدگاه تکنولوژیکی، حائز اهمیت هستند. برخی از باکتریهای لاکتیک خاص، از قبیل: *لاکتوباسیلوس پاراکازئی زیر گونه پاراکازئی*، *انتروکوکوس فکالیس*، *انتروکوکوس فاسیوم*، *لاکتوباسیلوس کورواتوس*، *لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس* توانایی تولید باکتریوسین را دارند [۲].
ازنظر صنعتی، کاربرد کشت های آغازگر ویژه باعث ایجاد کیفیت ثابت در محصول می گردد ولی منجر به تولید محصولی با محدودیت طعم می شود. از سوی دیگر، مصرف کنندگان، فرآورده های لبنی با طعم طبیعی و اصلی را ترجیح می دهند. به همین دلیل، جستجو وکاوش سویه های وحشی موجود در طبیعت و نیز در محصولات تخمیری سنتی، جهت تولید فرآورده های لبنی جدید با طعم اصیل و طبیعی مورد توجه بسیار می باشد. پنیرهای حاصل از شیر خام که به صورت سنتی تولید می شوند، پتانسیل جداسازی نژادهای جدید جهت بهره برداری در صنعت لبنیات را دارا می باشند[۱].
درمیان چندین پنیر حاصل از شیر خام در ایران، پنیر لیقوان معروف ترین و مشهورترین پنیر سنتی ایرانی می باشد که از شیر خام گوسفند تولید می شود. این شهرت و مقبولیت مدیون طعم وآرومای خاص و مطلوب این نوع پنیر می با شد[۳].

1. indigenous

این پنیربه عنوان یک نوع پنیر نیمه نرم با طعم ترش مطلوب، رنگ کرم و میزان چربی بالا وبافت ترد طبقه بندی می شود.پنیر لیقوان در یک روستایی به همین نام در استان آذربایجان شرقی در برخی از پایلوت های کوچک محلی تولید می شود. در تولید این پنیر هیچ نوع استارتری استفاده نمی شود وتنها رنین طبیعی افزوده شده وسپس دلمه نهایی بریده شده و با استفاده از پارچه صافی مخصوصی آبگیری شده وپرس می شود. دلمه بدست آمده در داخل آب نمک ۲۲٪ به مدت ۲۴ ساعت و پس از آن در داخل آب نمک ۱۲٪ برای دوره رسیدگی سه ماهه قرار می گیرد.دوره رسیدگی در داخل غارهای زیرزمینی که بطورطبیعی دارای دمای سرد می باشند، صورت می گیرد. باکتری های اسید لاکتیک ذاتی موجود در شیر، دارای فعالیت پروتئولیتیک، لیپولیتیک و گلیکولیتیک در دوره رسیدن بوده و ترکیبات آروماتیک مختلفی را تولید می کنند که طعم و آرومای اصلی را به پنیر می دهد.
جستجو وشناسایی استارتر ذاتی و نژادهای وحشی جهت تولید پنیر لیقوان با طعم مخصوص به خود در مقیاس صنعتی لازم و ضروری می باشد.

۲- موادوروشها

۲-۱- نمونه برداری

نمونه برداری در فصل تابستان و از چهار مرحله شیر، دلمه، پنیرتازه (یک روزه) و پنیر رسیده (سه ماه رسیدگی) از ده تولید کننده پنیرلیقوان از روستای لیقوان تبریز صورت گرفت. سپس نمونه ها تحت شرایط سردخانه (دمای ۴ درجه سانتیگراد) به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل گردیدند.

۲-۲- تولید پنیر لیقوان

در فرآیند تولید پنیر لیقوان، شیرخام کامل گوسفند، پس از جمع آوری و انتقال به کارگاه تولید پنیر، جهت صاف کردن از طریق پارچه های صافی، داخل ظروف فلزی بزرگی ریخته شده و از شیر نمونه برداری گردید. سپس دمای شیر بوسیله قرار دادن بشکه های آب سرد داخل ظروف بزرگ حاوی شیر، به حدود ۲۵ درجه سانتیگراد کاهش داده شد و در این دما به شیر آنزیم رنین تجاری (میتوMEITO) یا رنی

لسه اضافه گردید. عمل انعقاد شیر حدود دو ساعت به طول انجامید. عمل نمونه برداری از دلمه در این مرحله صورت گرفت. سپس دلمه حاصل به قطعاتی برش خورده و توسط پارچه هایی پوشیده شده و بخش اعظم آب پنیر در این مرحله حذف گردید. انتهای پارچه های صافی سپس محکم بسته شده وعمل آبگیری از پنیر به مدت ۵ ساعت طول کشید وبعد از آن دلمه پرس شده به قطعات بلوک مانند برش خورده و داخل آب نمک ۲۴ درصد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفته وسپس ذرات درشت نمک جامد در سطح آن پاشیده شد و به مدت ۲۴ ساعت در همین حالت باقی ماندند و نمونه های پنیر تازه در این مرحله جمع آوری گردیدند. سپس در روز بعد، قالب های برش خورده پنیر در داخل حلب های با آب نمک ۱۲-۱۱ درصد قرار گرفته وحلب های پنیر به غارهای زیرزمینی با درجه حرارت طبیعی (۱۰-۸ درجه سانتیگراد) منتقل شدند و حداقل به مدت ۳ ماه دوره رسیدگی را سپری کردند. در حین فرایند تولید این پنیر هیچ استارتری اضافه نشد. پنیر رسیده در انتهای دوره رسیدگی جمع آوری شد.

۲-۳- ایزولاسیون وشناسایی جدایه های باکتریایی(آماده سازی نمونه های شیر، دلمه وپنیر)

جهت نمونه های شیر، به طور مستقیم عمل رقت سازی دهدهی در آب پپتونه ۰/۱٪ استریل صورت گرفت و برای نمونه های دلمه و پنیر تازه و رسیده، ابتدا ۲۵ گرم از دلمه یا پنیر به ۲۲۵ سی سی محلول سیترات سدیم ۲٪ وزنی- حجمی استریل اضافه شد و مجموعه به داخل کیسه استریل مخصوص دستگاه استومکر (مدل Seward, UK) منتقل گردید و داخل دستگاه به مدت ۵ دقیقه با سرعت نرمال مخلوط شد، سپس محلول حاصل به عنوان رقت ۰/۱ برای تهیه رقت های بعدی استفاده شد. برای رقت های بعدی 10^{-2}تا 10^{-7} از آب پپتونه استریل ۰/۱ درصد وزنی- حجمی استفاده گردید. سپس از لوله های حاوی رقت های تهیه شده به میزان ۰/۱ میلی لیتر بوسیله سمپلر (کشت سطحی) روی سطح محیط های کشت MRS-Agar برای ایزولاسیون لاکتوباسیل ها،(MRS Agar+vancomycin (20μg/mL برای جداسازی لویکونوستوک ها، M17-Agar برای لاکتوکوکوس ها و KAA[1] برای انتروکوکوس ها منتقل گردید (هر کشت در دوتکرار انجام شد). لازم به ذکر است برای هر محیط کشت از رقت های مورد نظر یک کشت آمیخته(Pour plate) نیز صورت گرفت. سپس محیط های کشت تلقیح شده داخل جاربی هوازی مرک به همراه گاز پک مدل A در سه دمای ۳۰، ۳۷ و۴۵ درجه سانتیگراد جهت رشد باکتریهای مزوفیل وترموفیل قرارگرفت. مدت زمان گرمخانه گذاری بسته به نوع باکتری بین ۲۴ تا ۴۸ ساعت وحداکثر ۷۲ ساعت در نظرگرفته شد.

پس از سپری شدن مدت گرمخانه گذاری و خروج پلیت ها از داخل جار بی هوازی، ابتدا پلیت های حاوی ۲۵ تا ۳۰۰ کلونی را شمارش کرده وسپس از پلیت های دارای بالاترین رقت، ۴ تا ۵ کلونی که از نظر شکل، رنگ و اندازه متفاوت بودند، برداشته شد و جهت خالص سازی بیشتر ۲ تا ۳ بار بر روی همان محیط های کشت قبلی، کشت خطی مجدد داده شد.

سپس کلونی های خالص بدست آمده درهر پلیت مورد آزمونهای رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و مورفولوژی در زیر میکروسکوپ قرار گرفتند. در نهایت، فقط جدایه های گرم مثبت و کاتالاز منفی جداسازی شده و داخل محیط MRS broth حاوی ۲۰٪ گلیسرول نگهداری و به صورت انجمادی خشک شدند. در مجموع حدود ۹۵ جدایه از مجموع نمونه ها (شیر، دلمه، پنیر تازه و پنیر رسیده) جدا گردید و مورد آزمون های بیوشیمیایی و تست های تائیدی قرار گرفتند.

۲-۴- آزمونهای بیوشیمیایی و تست های تاییدی

ابتدا بر روی هر کلونی خالص بدست آمده، آزمون رنگ آمیزی گرم وتست کاتالاز صورت گرفت. پس از اطمینان از گرم مثبت وکاتالاز منفی بودن کلونی یا جدایه مورد نظر، خصوصیات مورفولوژی سلولی در زیر میکروسکوپ بررسی شد و باسیل یا کوکسی بودن آن تایید گردید. تست رشد در دمای ۱۰ و۴۵ درجه سانتیگراد، رشد در غلظت نمک ۶/۵٪، رشد در۹/۶ =pH، تست هیدرولیز آرژنین به کمک معرف نسلر، هیدرولیز اسکولین، تولید گاز دی اکسید کربن از قند

1 Kanamycin aesculin azid agar

گلوکزدر MRS broth در لوله دورهام جهت تشخیص همو یا هتروفرمانتاتیو بودن، تجزیه سیترات در محیط سیمون سیترات آگار و آزمون وگوس- پروسکوئر در محیط MR-VP به عنوان تست های تائیدی صورت گرفتند.

در نهایت، جدایه های کوکسی گرم مثبت، کاتالاز منفی، هموفرمنتاتیو قادر به رشد در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد ولی عدم توانایی رشد در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد و غلظت نمک ۶/۵٪ به عنوان جنس لاکتوکوکوس در نظر گرفته شدند. آزمون هیدرولیز آرژنین و تولید استوئین در تست VP و تخمیر کربوهیدراتها به عنوان آزمونهای تاییدی بیشتر وشناسایی تا مرحله گونه وزیر گونه صورت گرفت. جهت شناسایی و گروه بندی تا سطح گونه از کیت های API 50 CH (بیومریکس فرانسه)[1] استفاده شد.

کوکسی های گرم مثبت، کاتالاز منفی، هموفرمانتاتیو قادر به رشد در دمای ۱۰و۴۵ درجه سانتیگراد و نیز قادر به رشد در غلظت ۶/۵ ٪ نمک و pH= ۹/۶ به عنوان جنس انتروکوکوس در نظرگرفته شدند. جهت شناسایی تا حد گونه تست API 20 STREP (بیومریکس فرانسه) صورت گرفت.

کوکسی های گرم مثبت، کاتالاز منفی هموفرمنتاتیو با آرایش سلولی تتراد به عنوان پدیوکوکوس وکوکسی های گرم مثبت ،کاتالاز منفی هتروفرمنتاتیو که قادر به هیدرولیز آرژنین نبودند، به عنوان لویکونستوک در نظر گرفته شدند.

جهت باکتری های میله ای شکل گرم مثبت و کاتالازمنفی، رشد در دمای ۱۵ و ۴۵ درجه سانتیگراد و نیز تولید گاز CO_2 از گلوکز در لوله دورهام صورت گرفت.

در پایان،پس از شناسایی جدایه ها در سطح جنس با استفاده از تست های بیوشیمیایی وتاییدی، آزمون تخمیر قند وکربوهیدراتها با استفاده از دستورالعمل API وکیت های تخمیر قند به صورت ذیل صورت پذیرفت. به طوریکه جهت جدایه های تائید شده به عنوان لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس، پدیوکوکوس و لویکونستوک از کیت و روش API 50 CH وجهت جدایه های تائید شده به عنوان انتروکوکوس از کیت و روش API 20 STREP استفاده گردید. از کیت مطابق دستور العمل شرکت سازنده استفاده گردید.

1 .Biomeriux, France

۲-۵- آنالیز آماری

پروفایل های بدست آمده توسط کیت هایAPI 50 CH وAPI 20 STREP با کمک با ضریب Simple matching coefficient با هم مقایسه شدند و با استفاده از آنالیز UPGMA[2] از برنامه Multi-variate – Statistical Package program خوشه بندی[3] شدند.

داده های حاصل از log cfu/g در نرم افزار Minitab مورد آنالیز واریانس قرار گرفته و میانگین های حاصل از آن در نرم افزار MSTATC مورد مقایسه میانگین با آزمون LSD قرار گرفته و سطوح معنی داری آن با حروف a,b,c,... مشخص شدند.

۳- نتایج وبحث

ایزولاسیون و شناسایی باکتری های اسید لاکتیک از پنیر لیقوان در چهار مرحله مختلف شیر، دلمه، پنیر تازه یک روزه و پنیر رسیده (سه ماه دوره رسیدگی) با استفاده از تست های تکمیلی و تائیدی تا مرحله جنس و سپس باکمک کیت های API تا مرحله گونه صورت گرفت.

توزیع باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از محیط کشت های مختلف برای پنیر لیقوان (در چهار مرحله) در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول۱ توزیع باکتری های اسیدلاکتیک جدا شده از محیط کشت های مختلف در طول فراوری از شیر تا پنیر لیقوان رسیده از تعداد ده نمونه

جنس های باکتری	محیط کشت				
	MRS	MRS+ vancomycin	M17	KAA	Total
لاکتوباسیلوس	۲۲	۹	۱	–	۳۲
لاکتوکوکوس	۳	–	۱۸	۴	۲۵
انتروکوکوس	۴	–	۱۰	۱۸	۳۲
پدیوکوکوس	۳	–	۱	–	۴
لویکونستوک	۱	۱	–	–	۲
مجموع	۳۳	۱۰	۳۰	۲۲	۹۵

2. Unweighted pair groups average linkage analysis
3. Cluster

این جدول اطلاعاتی در مورد انتخاب پذیری و مناسب بودن محیط کشت های مختلف برای باکتری های لاکتیک ارائه می دهد. محیط MRS agar برای باکتری های جنس لاکتوباسیلوس مناسب بوده است و این جنس به طور قابل ملاحظه ای در این محیط غالب بود (۲۲ جدایه از ۳۳) (جدول۱). گورسس و همکاران[1] (۲۰۰۸) نتایج مشابهی را برای پنیر تولوم[2] نشان دادند[۳]. از سوی دیگر، سایر جنس ها از قبیل لاکتوکوکوس (۳جدایه از ۳۳)، انتروکوکوس (۴ جدایه از ۳۳) و پدیوکوکوس (۳جدایه از ۳۳) و نیز لویکونستوک (۱ جدایه از ۳۳) در این محیط کشت پیدا شدند. لوپز – دیاز وهمکاران[3] (۲۰۰۰) نیز گزارش کردند که تعداد باکتری های جنس لاکتوباسیلوس و لاکتوکوکوس در این محیط بیش از سایر جنس ها می باشد، که این امر مناسب بودن محیط MRS را برای جداسازی گونه های این جنس تائید می کند[۴].

بیش از نیمی از جدایه ها بر روی محیط MRS (۲۲ جدایه از ۳۳) لاکتوباسیلوس بودند، و بقیه باکتری ها کوکسی شکل بودند.محیط MRS به دلیل میزان انتخاب پذیری پایین این محیط، اجازه رشد جنس های مختلف از اسید لاکتیک باکتری های کوکسی شکل را هم می دهد[۱].

فاکس وهمکاران[4] (۲۰۰۰) انتخاب پذیری خوبی را از محیط M17 agar برای ایزولاسیون لاکتوکوکسی ها گزارش کردند[۵]. در مطالعه ما ، همچنین اکثر نژادهای جدا شده از این محیط کشت، لاکتوکوکسی بودند (۱۸ جدایه از ۳۰). در مقابل، نوید قاسمی زاد و همکاران[5] (۲۰۰۹) نشان دادند که اکثر جدایه های جداشده از محیط M17 انتروکوکوس بودند[۲]. تقریبا تمام ۳۰ جدایه جداشده از محیط M17 اسیدلاکتیک باکتریهای کوکسی شکل بودند که شامل لاکتوکوکوس (۱۸جدایه از ۳۰)، انتروکوکوس (۱۰جدایه از ۳۰) و پدیوکوکوس (۱ جدایه از ۳۰) بودند. تنها یک جدایه باقی مانده متعلق به جنس لاکتوباسیلوس بود (۱ جدایه از ۳۰). کارایی و مفید بودن این محیط توسط سایر محققان نیز به اثبات رسیده است[۴].

1. Gurses M. et al.
2. Tulum cheese
3. Lopez-Diaz et al
4. Fox et al.
5. Navidghasemizad et al.

محیط KAA انتخاب پذیری بالایی را برای جنس انتروکوکوس نشان داد(۱۸ جدایه از ۲۲). گورسس و اردوگان[6] (۲۰۰۶) اکثر باکتری های جنس انتروکوکوس را از محیط کشت PCA agar جداکردند[۳].

محیط MRS غنی شده با آنتی بیوتیک ونکومایسین، به دلیل مقاومت بالای جنس لویکونستوک در برابر این آنتی بیوتیک، یک محیط مناسب و انتخابی برای این جنس به شمار می رود. هرچند که، سایر باکتریهای اسید لاکتیک مانند بسیاری از گونه های جنس لاکتوباسیلوس توانایی رشد بر روی این محیط را دارند(جدول۱)[۵].

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود، روند تغییرات باکتری ها بر حسب Log cfu/ml(gr) در محیط کشت های مختلف مورد استفاده جهت اسیدلاکتیک باکتری ها در سه دمای ۳۰، ۳۷ و۴۵ درجه سانتیگراد از مرحله شیر تا پنیر لیقوان رسیده (در طول مراحل مختلف تولید) ارائه شده است. در محیط MRS، تعداد کلونی ها از مرحله تولید شیر تا مرحله دلمه افزایش (بدون تفاوت آماری معنی دار در سطح ۵٪) و پس از آن تا مرحله پنیر رسیده کاهش معنی داری ($P<0.05$) داشته است. در محیط کشت MRS+vancomycin، هیچ روند افزایشی یا کاهشی ثابت ویکنواختی مشاهده نشد. در محیط کشت M17 ،یک روند افزایشی از شیر تا دلمه فقط در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده شد که این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود($P<0.05$). در محیط کشت KAA، در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد، روند افزایشی ولی بدون تفاوت آماری معنی دار($P<0.05$) از شیر تا پنیر تازه و بعد از آن کاهش معنی داری ($P<0.05$) تا مرحله پنیر رسیده مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۳ خصوصیات بیوشیمیایی باکتری های اسیدلاکتیک ایزوله شده از مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان از شیر تا پنیر رسیده را نشان می دهد. در میان لاکتوباسیل ها، فقط یک گونه در دمای بالا و غلظت نمک ۶/۵٪ رشد نشان داد. تمام لاکتوباسیل ها رشد در pH 9.6 و عدم رشد در محیط VP را نشان دادند. تنها لاکتوباسیلوس هتروفرمنتاتیو، *Lb.brevis* بود.

6. Gurses M. and Erdogan A.

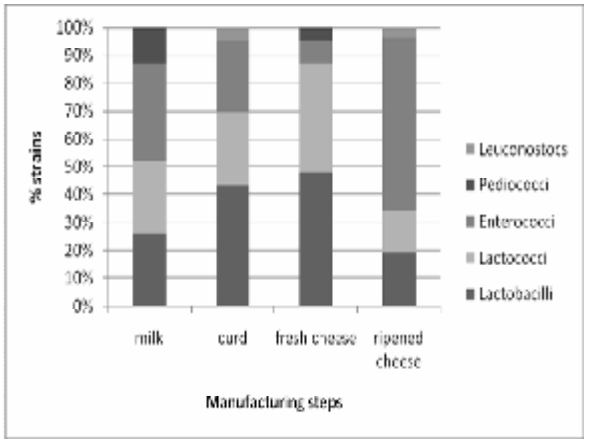
جدول ۲ تغییرات تعداد کلونی ها در محیط کشت های مختلف اسیدلاکتیک باکتری ها طی مراحل مختلف تولید از شیر تا پنیر رسیده لیقوان بر حسب **,** log cfu/g, log cfu/mL میانگین وانحراف معیار آنها.

محیط کشت	دمای اینکوباسیون°C	محصول			
		شیر	دلمه	پنیرتازه	پنیررسیده
MRS	۳۰	6.82±0.02 BCDEFGHIJK*	7.68±0.3 ABC	6.5±0.04 FGHIJKLM	5.92±0.03 JKLMN
	۳۷	7.08±0.12 ABCDEFGHI	7.91±0.01 A	7.86±0.01 AB	6.62±0.03 DEFGHIJKL
	۴۵	4.65±0.04 O	5.82±0.02 KLMN	5.86±0.24 JKLMN	1 Q
MRS+ vancomycin	۳۰	6.10±0.09 HIJKLMN	5.57±0.04 MNO	7.12±0.07 ABCDEFGH	5.64±0.06 LMNO
	۳۷	6.28±0.15 GHIJKLM	5.74±0.07 LMN	7.36±0.06 ABCDEF	6.07±0.09 IJKLMN
	۴۵	1 Q	1 Q	1 Q	1 Q
M17	۳۰	6.43±0.05 FGHIJKLM	7.58±0.15 ABCDE	6.43±0.05 FGHIJKLM	7.08±0.12 ABCDEFGHI
	۳۷	6.56±0.07 EFGHIJKLM	7.2±0.14 ABCDEFG	7.08±0.12 ABCDEFGHI	7.38±0.12 ABCDEF
	۴۵	1Q	1Q	6.88±0.16 ABCDEFGHIJ	7.62±0.03 ABCD
KAA	۳۰	6.55±0.06 EFGHIJKLM	6.67±0.02 CDEFGHIJKL	6.24±0.1 GHIJKLM	3.5 P
	۳۷	5.88±0.16 JKLMN	6.23±0.09 GHIJKLM	5.79±0.14 KLMN	6 JKLMN
	۴۵	6.0±0.23 JKLMN	6.44±0.04 FGHIJKLM	6.52±0.02 FGHIJKLM	5.08±0.12 NO

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

در میان کوکسی ها، تنها باکتری های جنس انتروکوکوس رشد در دمای بالا و در pH 9.6 نشان دادند. تمام کوکسی ها در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد رشد داشتند. *لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس و لویکونستوک لاکتیس* در غلظت بالای نمک ۶/۵٪ رشد نداشتند. دو گونه هتروفرمنتاتیو از جنس لویکونستوک *Leu.lactis, Leu.mesenteroides,* بودند. تمام کوکسی ها به استثنای *Leu.mesenteroides* در محیط VP رشد داشتند. هیدرولیز آرژنین برای *Leu.lactis* و *Leu.mesenteroides* منفی بود.

به منظور درک نقش و اهمیت هر یک از این گونه های لاکتیکی، ابتدا تغییرات آنها در طی رسیدگی و در مراحل مختلف بررسی شد. شکل۱، روند تغییرات (فراوانی سویه های جداشده) هر یک از جنس های اسیدلاکتیک باکتری ها در مراحل مختلف تولید نشان می دهد. در مرحله شیر، جنس انتروکوکوس غالب بود (تعداد سویه های جداشده) و بعد از آن به ترتیب جنس های لاکتوباسیلوس و لاکتوکوکوس و با درصد اندکی جنس پدیوکوکوس جمعیت اصلی شیر را تشکیل می دادند. دردوره رسیدگی در مراحل بعدی، انتروکوکوس ها و به میزان کمتری لاکتوباسیلوس ها، روند افزایشی نشان دادند، اما لاکتوکوکوس ها به تدریج کاهش یافتند. این پدیده و ویژگی منطقی به نظر می رسد، چرا که در اکثرانواع پنیرها، روند مشابهی مشاهده شده است.



شکل ۱ تغییرات جنس های مختلف اسید لاکتیک باکتری ها (بر حسب درصد یا تعداد سویه های جدا شده از ده نمونه محصول) طی فراوری و مراحل مختلف تولید پنیر لیقوان

جدول ۳ خصوصیات بیوشیمیایی اسیدلاکتیک باکتری های جدا شده از پنیر لیقوان در مراحل مختلف تولید از شیرتا پنیر رسیده

خواص بیوشیمیایی / نژادها	رشد در ۱۵ درجه سانتیگراد	رشد در ۴۵ درجه سانتیگراد	رشد در ۶٫۵ درصد نمک	رشد در pH9.6	تولید گاز از گلوکز	تست VP	هیدرولیز آرژنین	مصرف سیترات
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	+	−	−/+	+	−	−	−	−
لاکتوباسیلوس پاراکازئی زیرگونه پاراکازئی	+	−	−	+	−	−	−	−
لاکتوباسیلوس برویس	+	−	−	+/−	+	−	+	−
لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه دلبروکی	−	+	+	+	−	−	−	−
لاکتوباسیلوس فروکتی ورنس	−	−/+	−	+	−	−	−	−
لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس	+	−	−	−	−	+	+	−
لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه کرموریس	+	−	−	−	−	−	+	+
لویکونوستوک لاکتیس	+	−	−	−	+	+	−	−
لویکونوستوک مزنترویدس	+	−	−/+	−	+	−	−	−
پدیوکوکوس پنتوزاسئوس	+	−	+	−	−	+	+	−
انتروکوکوس فکالیس	+	+	+	+	−	+	+	−
انتروکوکوس فاسیوم	+	+	+	+	−	+	+	−
انتروکوکوس دورانس	+	+	+	+	−	+	+	−

+: واکنش مثبت −: واکنش منفی

در اولین مرحله فراوری، لاکتوکوکسی ها که مسئول اسیدیفیکاسیون شیر هستند، طیف غالب فلور لاکتیکی را تشکیل می دهند و تا مرحله تشکیل دلمه پیشرفت می کنند. در مراحل بعدی، سایر باکتری های لاکتیکی از قبیل انتروکوکوس ها و لاکتوباسیلوس ها غالب می شوند.

در پنیر لیقوان رسیده درصد بالایی از باکتری های جنس انتروکوکوس پیدا شد. به دلیل حضور پیوسته باکتری های این جنس در انواع مختلف پنیرها، تاثیر ونقش انتروکوکوس ها در تولید پنیر مورد بررسی و مطالعه قرارگرفته است.برخی نظرات و عقیده های متنا قض در مورد این گروه از باکتری های اسیدلاکتیک مطرح می باشد. برخی محققان، اثر مثبت *Ent. faecalis* var. *liqefaciens* را در کیفیت پنیر راکوفورت به اثبات رسانده اند، (دویود [1] ۱۹۶۹)[۶] ودویود و مولر[2] (۱۹۶۹)[۷] و دویود و دسمازید[3](۱۹۷۱)[۸]، تاثیر مفید انتروکوکوس ها را بررشد سایر باکتری های اسیدلاکتیک پیدا کردند. ازسوی دیگر، تولید باکتریوسین (انتروسین) توسط انتروکوکوس ها، روی باکتری های پاتوژن در پنیر و نیز باکتری های مولد آمین های بیوژنیک مانند برخی لاکتوباسیل ها، اثر کنترل کنندگی دارد. (گیرافا[4] ۱۹۹۵، آیمریچ و همکاران[5] ۱۹۹۶، فاریاس و همکاران[6] ۱۹۹۴، جوستن و نونز[7] ۱۹۹۶) [۹-۱۲]. در مقابل، برخی اثرات منفی برسلامت و کیفیت پنیر برای انتروکوکوس ها گزارش شده است. سالوادوری[8] (۱۹۶۹)، توسعه طعم تلخ را به دلیل کاربرد *انتروکوکوس فکالیس* به عنوان استارتر در تولید پنیر گورگونزولا، متوجه شد[۱۳].

جدول۴، توزیع گونه های باکتری های اسید لاکتیک موجود در نمونه های مورد آزمایش درمراحل مختلف تولید از شیر تا پنیر رسیده را نشان می دهد. جنس لاکتوباسیلوس شامل (۳۳/۶۸٪) *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*(۲۰/۰٪) فراوان ترین گونه لاکتوباسیل، بعد از آن به ترتیب *لاکتوباسیلوس پاراکازئی زیر گونه پاراکازئی* (۷/۳۶٪)، *لاکتوباسیلوس برویس* (۳/۱۵٪)، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *دلبروکی* (۲/۱۰٪) و لاکتوباسیلوس *فروکتی ورانس* (۱/۰۵٪) در کل مراحل تولید بود. به طور کلی ، جنس لاکتوباسیلوس دارای یک روند افزایشی از شیر(۲۶/۰۸٪) به دلمه (۴۳/۴۷٪) بود وپس از آن یک سیر نزولی را تا مرحله پنیر رسیده (۱۹/۲۳٪) نشان داد. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تنها گونه ای از جنس لاکتوباسیلوس بود که در تمام مراحل تولید یافت شد. *لاکتوباسیلوس برویس*، تغییر قابل ملا حظه ای را در طی دوره رسیدگی نشان نداد. در این خصوص گورسس و اردوگان نتایج مشابهی را درمورد *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس کورواتوس* در تحقیق شان نشان دادند[۳]. باکتری های *لویکونستوک مزنترویدیس* و *لویکونستوک لاکتیس* به ترتیب در دلمه و پنیر رسیده پیدا شدند. *لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس* تقریبا ۲۶/۰۸٪ ازباکتری های لاکتیکی را درنمونه های شیر و دلمه تشکیل می داد و پس از آن تا مرحله پنیر رسیده کاهش یافت. روند مشابهی توسط گورسس و اردوگان در پنیر تولوم مشاهده گردید[۳]. *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس*، تنها در مراحل شیر و پنیر تازه یافت شدند. در نهایت، تعداد متنابهی از باکتری های جنس انتروکوکوس در نمونه های ما مشهود بود، به خصوص دو گونه *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم*، گونه های غا لب(۱۵/۷۸٪) را در کل مراحل تولید از ابتدا (شیر) تا انتها (پنیر رسیده) تشکیل می دادند. *انتروکوکوس فکالیس* یک گونه متداول است که به صورت مکرر ومتناوب از انواع مختلف پنیر مانند پنیر آبی ایزوله شده است[۴]. این جنس، در پنیرهای سنتی مختلف مانند پنیر فتا، مانچگو[9]، تلم[10]، کومته[11]، فونتینا[12]، سررا[13] و سبریرو[14] (سنتنو وهمکاران[15] ۱۹۹۹ ،سارانتینوپولوس وهمکاران[16] ۲۰۰۲، گیرافا ۲۰۰۳، مارینو و همکاران[17] ۲۰۰۳ [۱۴-۱۷].

1. Devoyod
2. Muller
3. Desmazeaud
4. Giraffa
5. Aymerich et al.
6. Farias et al.
7. Joosten and Nunez
8. Salvadori

9 .Manchego
10. Teleme
11. Comte
12. Fontina
13. Serra
14. Cebreiro
15. Centeno et al.
16. Sarantinopoulos et al.
17. Marino et al.

جدول ۴ توزیع باکتری های اسیدلاکتیک در دوره رسیدگی از مرحله شیر تا پنیر لیقوان رسیده بر اساس خصوصیات فنوتیپیک (API 50 CH, API 20 STREP)

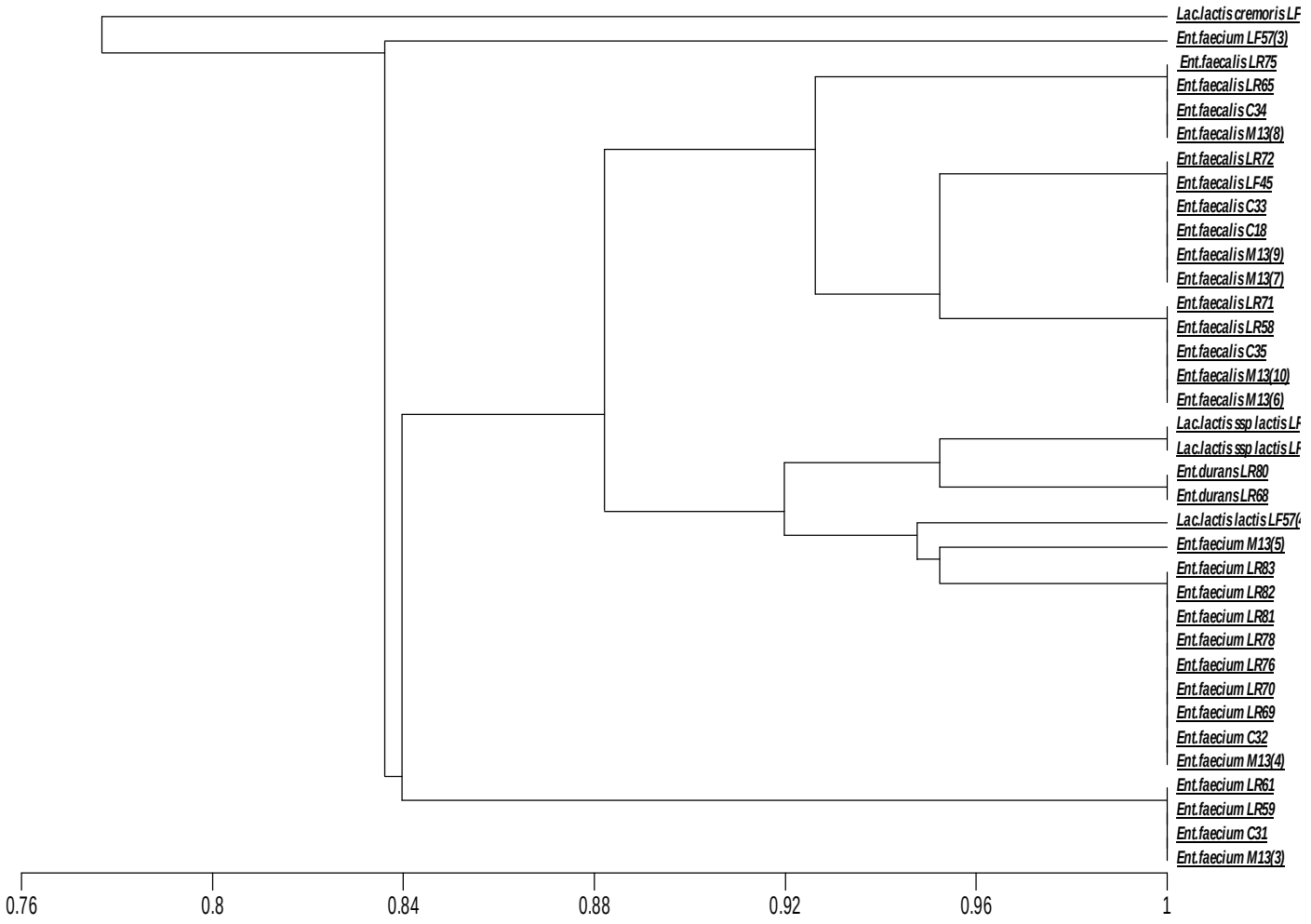
جنس	گونه	شیر(٪)*	دلمه(٪)	پنیر تازه(٪)	پنیر رسیده(٪)	مجموع(٪)
لاکتوباسیلوس		6(26.08)	10(43.47)	11(47.82)	5(19.23)	32(33.68)
	پلانتاروم	4(17.39)	5(21.73)	8(34.78)	2(7.69)	19(20.00)
	برویس	1(4.34)	-	1(4.34)	1(3.84)	3(3.15)
	پاراکازئی زیر گونه پاراکازئی	1(4.34)	3(13.04)	1(4.34)	2(7.69)	7(7.36)
	دلبروکی زیرگونه دلبروکی	-	2(8.69)	-	-	2(2.10)
	فروکتی ورانس	-	-	1(4.34)	-	1(1.05)
لویکونستوک		-	1(4.34)	-	1(3.84)	2(2.10)
	مزنترویدس	-	1(4.34)	-	-	1(1.05)
	لاکتیس	-	-	-	1(3.84)	1(1.05)
لاکتوکوکوس		6(26.08)	6(26.08)	9(39.13)	4(15.38)	25(26.31)
	لاکتیس زیرگونه لاکتیس	6(26.08)	6(26.08)	8(34.78)	4(15.38)	24(25.26)
	لاکتیس زیرگونه کرموریس	-	-	1(4.34)	-	1(1.05)
پدیوکوکوس		3(13.04)	-	1(4.34)	-	4(4.21)
	پنتوزاسئوس	3(13.04)	-	1(4.34)	-	4(4.21)
انتروکوکوس		8(34.78)	6(26.08)	2(8.69)	16(61.53)	32(33.68)
	فاسیوم	3(13.04)	2(8.69)	1(4.34)	9(34.61)	15(15.78)
	فکالیس	5(21.73)	4(17.39)	1(4.34)	5(19.23)	15(15.78)
	دورانس	-	-	-	2(7.69)	2(2.10)
مجموع(٪)		23(100)	23(100)	23(100)	26(100)	95(100)

* اعداد داخل پرانتز نشان دهنده درصد باکتری ها هستند

۴- پروفایل تخمیر کربوهیدرات

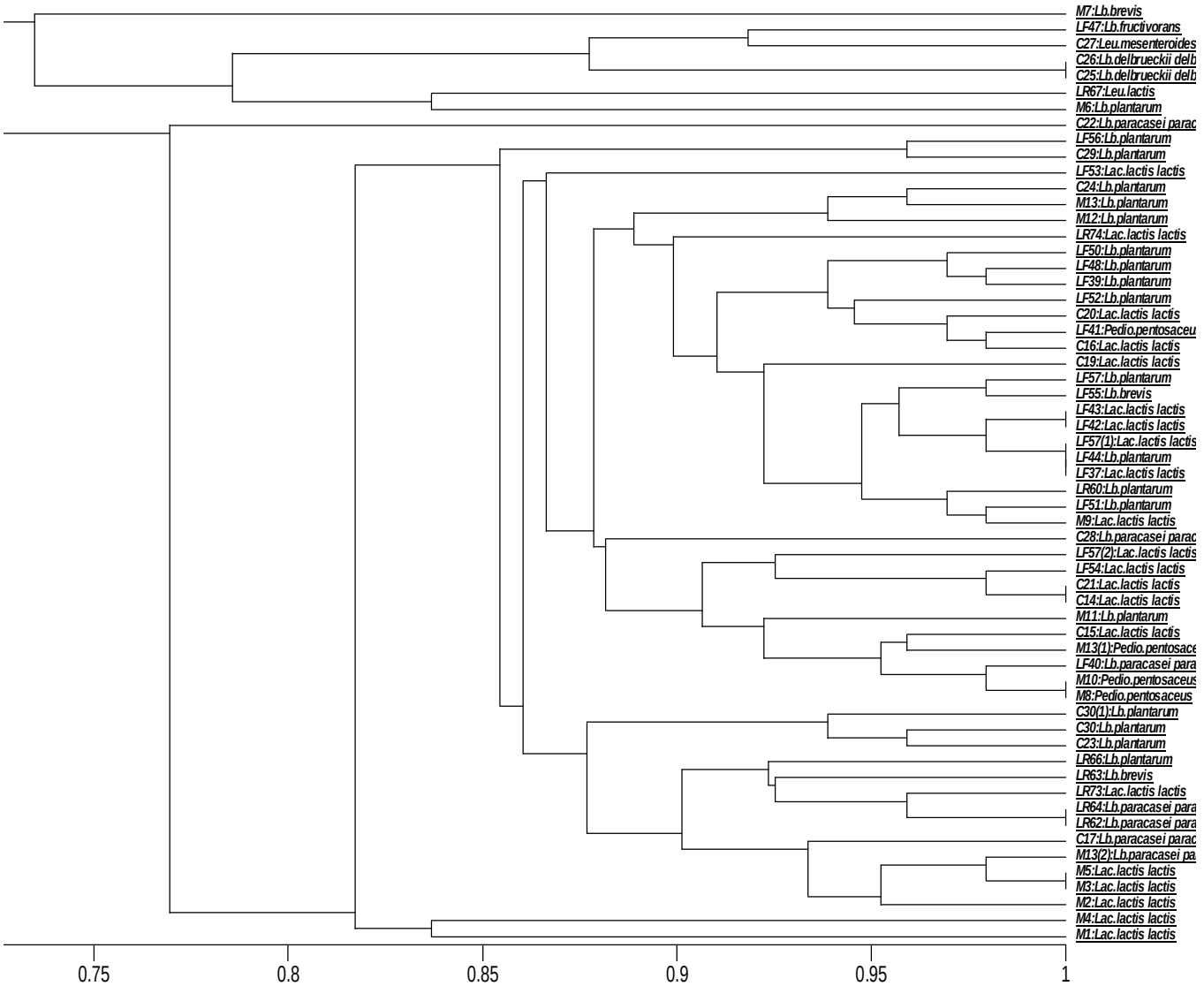
در مجموع، ۱۱ پروفایل متفاوت تخمیر کربوهیرات با استفاده از کیت های API 20 STREP مشاهده شدند (شکل۲). در زمانیکه مورد آنالیز آماری قرارگرفتند درجه بالایی از مشابهت را نشان دادند. دندوگرام بدست آمده پس از آنالیز UPGMA در شکل ۲ نشان داده شده است. (با استفاده از simple matching coefficient). خطوط عمودی دندوگرام نشان دهنده میزان شباهتی است که گروه های متصل شده به هم بوسیله این خطوط دارند.

با کمک کیت های API 50 CHL در مجموع، ۵۱ الگوی مختلف تخمیر قند مشاهده شد. دندوگرام بدست آمده پس از آنالیز UPGMA در شکل ۳، نشان داده شده است. (با استفاده از simple matching coefficient). خطوط عمودی دندوگرام نشان دهنده میزان شباهتی است که گروه های متصل شده به هم بوسیله این خطوط دارند.



شکل ۲ دندوگرام پروفایل تخمیر کربوهیدرات که توسط سیستم API 20 STREP بدست آمده است. ماتریس مشابهت پروفایل ها ، بوسیله روش UPGMA clustering مورد آنالیز کلاستر قرار گرفت

کدها: M(Milk),C(Curd),LF(Lighvan Fresh),LR(Lighvan Ripened cheese)



شکل ۳ دندوگرام پروفایل تخمیر کربوهیدرات که توسط سیستم API 50CH بدست آمده است. ماتریس مشابهت پروفایل ها، بوسیله روش UPGMA clustering مورد آنالیز کلاستر قرار گرفت.

کدها: M(Milk),C(Curd),LF(Lighvan Fresh),LR(Lighvan Ripened cheese)

۵- نتیجه گیری

در میان گونه های اسیدلاکتیک باکتری های پیداشده در نمونه های ما، که متعلق به جنس های انتروکوکوس، لاکتوباسیلوس و لاکتوکوکوس بودند، جمعیت اصلی لاکتیکی در حین مراحل تولید پنیر لیقوان را تشکیل می دهند.انتروکوکوس ها، بویژه در پنیر رسیده فلور غالب بودند. انتروکوکوس ها روند افزایشی ولاکتوکوکوس ها روند نزولی را در انتهای رسیدن نشان دادند. گونه های *لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس*، *انتروکوکوس فکالیس*، *انتروکوکوس فاسیوم ولاکتوباسیلوس پلانتاروم* نسبت به سایر گونه ها، از مراحل مختلف تولید در تعداد بالاتری شناسایی شدند. این حقیقت بر این امر دلالت می کند که این گونه ها نقش مهمی را در تولید و رسیدگی پنیر بازی

می کنند. به منظور کاربرد این نژادها در مقیاس صنعتی، توجه بیشتری باید معطوف به شناسایی دقیق تر این گونه ها در سطح زیرگونه گردد. جهت دستیابی به این هدف، تکنیک های دقیق تری مانند روشهای مولکولی مورد نیاز است.

۶- تشکر وقدردانی

نویسندگان مقاله از شرکت محترم صنایع لبنی رضوی جهت حمایت مالی این پروژه کمال تشکر و سپاسگزاری را دارد. همچنین از همکاری آقایان دکترمحمد زاد بزمی، مدیر گروه صنایع غذایی دانشگاه تبریز جهت در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاه میکروبیولوژی و مهندس پورا کرمی کارشناس کارخانه صنایع لبنی پگاه تبریز در خصوص کمک در جمع آوری نمونه ها در مراحل مختلف و نیز ازاستاد محترم جناب آقای دکتر خمیری جهت ارسال و در اختیار قرار دادن برخی جدایه های باکتری ها ی اسید لاکتیک، قدردانی می گردد.

۷- منابع

[1] Navidghasemizad, S. Hesari, J. Saris, P. and Nahaei, M. R. 2009. Isolation of lactic acid bacteria from Lighvan cheese, a semi hard cheese made from raw sheep milk in Iran. *International Journal of Dairy Technology,* vol. 62, No. 2, pp.260-264.

[2] Caridi, A. 2003. Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from the artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. *International Journal of Dairy Technology.* vol. 56, No. 2, pp.105-110.

[3] Gurses, M. Erdogan, A. 2006. Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Tulum Cheese during Ripening Period. *International Journal of Food Properties*, vol. 9, No. 3, pp. 551–557.

[4] Lopez-Diaz, T. M. Alonso, C. Roman, C. Garcia-Lopez, M. L. and Moreno, B. 2000. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiology*. Vol.17, No.1, pp. 23-32.

[5] Fox, P. F. McSweeney , P. Cogan, T.M. andGuinee, T.P. 2000. *Fundamentals of Cheese Science.* Gaithersburg, MD: Aspen Publishers , pp. 536–539.

[6] Devoyod, J. J. 1969. Microbial flora of Roquefort cheese IV. Enterococci. *Lait*, Vol.49, No. 489-490, pp.637-650.

[7] Devoyod, J. J and Muller, M. 1969. Microbiol flora of Roquefort cheese. III. Lactic streptococci and leuconostocs. Influence of various contaminating microorganisms. *Lait*, Vol.49, No.487, pp. 369-399.

[8] Devoyod, J. J. and Desmazeaud, M. 1971. Microbial associations in Roquefort cheese. III. Action of enterococci and lactose-fermenting yeasts on lactobacilli. *Lait* , Vol. 51, No. 507, pp. 399-415.

[9] Giraffa, G. 1995. Enterococci bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiology*. Vol. 12, pp. 291-299.

[10] Aymerich, T. Holo, H. Havarstein, L.S. Hugas, M. Garriga, M. and Nes, I.F. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from Enterococcus faecium, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins," *Appl. Environmental Microbiology*. vol. 62, No. 5, pp. 1676-1682.

[11] E. Farias, M. de Ruiz-Holgado, A. A. P. and Sesma, F. 1994. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: inhibition of food borne pathogens. *Journal of Food Protection*, vol.57, No.11, pp. 1013-1015.

[12] Joosten , H. M.L. J. Nunez, M. 1996. Prevention of histamines formation in cheese by bacteriocin producing lactic acid bacteria. *Appl. Environmental Microbiology*, vol. 62, No.4, pp. 1178-1181.

[13] Salvadori, B. B. 1969. Bitter flavor in blue cheeses. *Sci.Tecn. Latt.-Casearia*, Vol. 20, pp. 1-14.

[14] Centeno, J. A. Menéndez, S. Hermida, M. and Rodriguez-Otero, J. L. 1999. Effect of the addition of *Enterococcus faecalis* in

Cebreiro cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology,* Vol.48, No. 2, pp. 97–111.

[15] Sarantinopoulos, P. Kalantzopoulos, G. and Tsakalidou, E. 2002. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physiochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology* , Vol.76**,** No.1, pp**.**93–105.

[16] Giraffa, G. 2003. Functionality of Enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology,* Vol.88, No.2-3, pp. 215–222.

[17] Marino, M. Maifreni, M. and Rondinini, G. 2003. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters ,* Vol. 229, No. 1, pp. 133–140.

Isolation and identification of the indigenous lactic acid bacteria from Lighvan cheese

Edalatian M. R.[1], Habibi Najafi M. B. [2] *, Mortazavi S. A. [3], Nasiri M. R. [4], Basami M. R. [5], Hashemi S. M. [6]

1. Assistant Professor, Ferdowsi University of Mashhad, Department of Food Science and Technology, Mashhad, Iran.
2. Professor, Ferdowsi University of Mashhad, Department of Food Science and Technology, Mashhad, Iran.
3. Professor, Ferdowsi University of Mashhad, Department of Food Science and Technology, Mashhad, Iran.
4. Assoc. Professor, Ferdowsi University of Mashhad, Department of Animal Science, Mashhad, Iran.
5. Assoc. Professor, Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Veterinary, Mashhad, Iran.
6. MSc. of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

(Received:89/6/26 Accepted: 90/1/23)

Milk, curd, fresh (1-day old) and ripened (90-days old) Lighvan cheese (10 samples from each one) have been investigated for lactic flora as one the most well-known starter free sheep raw milk cheeses. MRS, MRS+vancomycin, M17 and KAA media were used for determining of Lactobacilli and Pediococci, Leuconostocs, Lactoccoci and Enterococci genera, respectively. Isolated strains were identified up to genus level with gram staining and catalase test, morphology, colony pigmentation,gas production from glucose,growth in 10°C and 45°C,salt tolerance,growth at pH9.6, argenine hydrolysis and citrate utilization. Random colonies were selected from each medium and confirmatory tests showed Enterococcus (33.68%), Lactobacillus (33.68%) and Lactococcus (26.31%) as the most common genera during the all stages. Finally, these isolated colonies were subjected to carbohydrate fermentation with API 50 CH and API 20 STREP methods and were determined up to species and sub species level. Totally,95 strains were isolated and identified during all production stages. API system results showed the following species: *Lactobacillus plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, *Lb. delbrueckii* ssp. *delbreuckii*, *Lb. fructivorans*, *Lac. lactis*. ssp. *lactis*, *Enterococcus.faecalis*, *Ent. faecium*, *Ent. durans*, *P. pentosaceus*, *Leu. lactis*, *Leu. mesenteroides*. The lactic acid bacteria changes revealed the pattern that Lactococcus and Lactobacillus were predominant at the first stages and replaced by Enterococcus at the end of production and ripening stage.The most dominant species during all satages follows as: *Lac. Lactis* ssp. *lactis* (25.26%), *Lb. plantarum* (20%), *Ent. Faecalis* (15.78%), *Ent. faecium* (15.78%). Thus, we expect that these species may play an important role in ripening and production of Lighvan cheese and also have potential application in industrial scale.

Key words: Lactic acid bacteria, Lighvan, Production stage, Raw milk cheese

* Corresponding Author E-mail address: habibi@ferdowsi.um.ac.ir