

# بررسی ویژگی‌های تکنولوژیکی و ضد میکروبی نژادهای انتروکوکوس فاسیوم زیر گونه فاسیوم غیر بیماری‌زا جدا شده از پنیر لیقوان

زهرا ایزدی مهر<sup>۱</sup>، مسعود یاورمنش<sup>۲\*</sup>، محمد باقر حبیبی<sup>۳</sup>، محمد رضا عدالتیان<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۰۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۱۷)

## چکیده

در این پژوهش ویژگی‌های تکنولوژیکی و ضد میکروبی سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از پنیر لیقوان مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی خواص تکنولوژیکی سویه‌ها نشان داد که تمامی آن‌ها به دلیل تولید کلنی سفید رنگ بر روی محیط روتنیوم رد میلک، توانایی تولید آگزوپلی ساکارید داشتند و فعالیت اتولیتیک این سویه‌ها به صورت کاهش درصد جذب در ۶۰۰ نانومتر بررسی شد و بیشترین فعالیت را سویه انتروکوکوس فاسیوم زیر گونه فاسیوم ۲ نشان داد. همچنین سویه‌ها بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری به دلیل کاهش pH تا ۲-۱/۵ واحد، فعالیت اسیدیفیکاسیون داشتند. فعالیت ضد میکروبی با روش Lawn on the Spot ارزیابی شد، که سویه‌های مورد بررسی در برابر باکتری‌های عامل فساد و پاتوژن‌ها از جمله لیستریا اینوکوا، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس فعالیت ضد میکروبی نشان ندادند. نتایج مقاومت سویه‌ها به شرایط اسیدی و دما معنی‌دار بود ( $P < 0,05$ )، به طوری که سویه انتروکوکوس فاسیوم زیر گونه فاسیوم ۴ بالاترین مقاومت به شرایط اسیدی و سویه انتروکوکوس فاسیوم زیر گونه فاسیوم ۵ بالاترین مقاومت به دما را نشان دادند. در نتیجه، این مطالعه نشان داد که به دلیل فعالیت تکنولوژیکی مناسب می‌توان از سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم زیر گونه فاسیوم به عنوان کشت همراه در محصولات لبنی تخمیری استفاده کرد.

کلید واژگان: انتروکوکوس فاسیوم، ویژگی‌های تکنولوژیکی، فعالیت ضد میکروبی

\* مسئول مکاتبات: yavarmanesh@um.ac.ir

## ۱- مقدمه

انتروکوکوس<sup>۱</sup>ها گروه بزرگی از باکتری‌های اسید لاکتیک<sup>۲</sup> هستند که در صنایع لبنیات و دیگر مواد غذایی تخمیری به وفور یافت می‌شوند [۱-۳]. انتروکوکوس‌ها معمولاً هوموفرمانتاتیو، گرم مثبت، بدون اسپور، کاتالاز منفی، اکسیداز منفی، بی هوازی اختیاری به صورت تکی، جفتی و یا زنجیره‌ای هستند [۴-۶]. رشد مطلوب آن‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد است. بیشتر گونه‌ها در محدوده دمایی ۱۰-۴۵ درجه سانتی‌گراد نیز رشد کرده و می‌توانند در ۶/۵ درصد NaCl، pH=۹/۶ و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه زنده باقی بمانند [۱]. انتروکوکوس‌ها بیش از ۲۰ گونه هستند، که شایع‌ترین آن‌ها انتروکوکوس فاسیوم<sup>۳</sup>، انتروکوکوس فکالیس<sup>۴</sup> و به میزان کمتر انتروکوکوس دورانس<sup>۵</sup> می‌باشد. آن‌ها توسط آلودگی‌های محیطی و یا روده‌ای در مواد غذایی خام (شیر و گوشت) رشد کرده و به دلیل توانایی تحمل شرایط سخت محیطی مانند درجه حرارت و نمک بالا قادر به تکثیر در طول تخمیر مواد غذایی می‌باشند [۷]. شرایط غیر بهداشتی تولید و فرآیند شیر به‌عنوان یکی از دلایل شیوع انتروکوکوس‌ها در فرآورده‌های لبنی می‌باشد. ورود آن‌ها در شیر یا به طور مستقیم از طریق مدفوع انسان یا حیوان و یا به طور غیر مستقیم از طریق آب‌های آلوده، تجهیزات شیر دوشی و محل ذخیره شیر (تانک) بوده است. انتروکوکوس‌ها با توجه به ماهیت سرماگرایی خود، مقاومت حرارتی بالا و سازگاری به سطوح مختلف، می‌توانند در شیرهای یخچالی افزایش یافته و بعد از پاستوریزاسیون نیز زنده باقی بمانند. بنابراین، آن‌ها بخشی از میکروفلور شیر خام و شیر پاستوریزه را تشکیل می‌دهند. گونه‌های مختلفی از انتروکوکوس‌ها در فرآورده‌های لبنی یافت شده‌اند، اما دو گونه انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس به‌عنوان گونه‌های بااهمیت شناخته می‌شوند [۸ و ۹]. از ویژگی‌های قابل توجه این باکتری‌ها می‌توان به پروتئولیز، لیپولیز و تجزیه سیترات در ایجاد عطر و طعم مطلوب

فرآورده‌های لبنی به خصوص پنیر اشاره کرد [۱۰ و ۱۱]. فعالیت پروتئولیتیک<sup>۶</sup> برای رشد باکتری‌های اسید لاکتیک در شیر ضروری است. باکتری‌های اسید لاکتیک سیستم پیچیده‌ای از آنزیم‌های پروتئاز و پپتیداز دارند تا از کازئین شیر به‌عنوان منبعی از اسید آمینه و نیتروژن استفاده کنند (۱۲) که میزان فعالیت‌های پروتئاز و پپتیداز در انتروکوکوس‌ها پایین بوده و فعال‌ترین آن‌ها انتروکوکوس فکالیس می‌باشد [۱۳-۱۶]. از طرفی، ارتباط مشخصی بین فعالیت‌های اسیدیته و پروتئولیتیک مشاهده نمی‌شود (۱۷)، اما گاهی اوقات این دو ویژگی به یکدیگر مرتبط بوده به طوری که گونه‌ای با پروتئولیتیک بیشتر، می‌تواند اسیدیته بیشتری تولید کند [۱۸-۲۰]. همچنین تولید اگزوپلی‌ساکارید<sup>۷</sup> یکی از ویژگی‌های مهم برای انتخاب باکتری‌های اسید لاکتیک نظیر انتروکوکوس‌ها می‌باشد، زیرا تولید اگزوپلی‌ساکارید تثبیت کننده و بافت دهنده فرآورده‌های لبنی است که منجر به ایجاد خامه نرم در محصول می‌گردد. بنابراین، از آن‌ها می‌توان به‌عنوان کشت آغازگر<sup>۸</sup> در تکنولوژی لبنیات خصوصاً شیرهای تخمیری استفاده کرد [۲۱-۲۳]. هیدرولیز تری‌گلیسریدها توسط باکتری‌های اسید لاکتیک از جمله انتروکوکوس‌ها گزارش شده است، که در مقایسه با سایر میکروارگانیزم‌ها فعالیت لیپولیتیک<sup>۹</sup> ضعیفی دارند. از بین گونه‌های انتروکوکوس، انتروکوکوس فکالیس و با یه میزان کمتر انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس دورانس لیپولیتیک<sup>۹</sup>ترین گونه‌ها هستند [۱۵ و ۱۴، ۱ و ۱۷ و ۲۴].

طبق بررسی پژوهشگران، بیشتر انتروکوکوس‌هایی که از مواد غذایی یا محیط ایزوله شده‌اند قادر به تولید باکتریوسین<sup>۱۰</sup> هستند. باکتریوسین تولید شده توسط انتروکوکوس‌ها اترووسین<sup>۱۱</sup> نامیده می‌شود. اترووسین تولید شده توسط دو گونه انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس نقش مهار کنندگی در برابر لیستریا مونوسی‌توژنز<sup>۱۱</sup> و استافیلوکوکوس اورئوس<sup>۱۲</sup> در فرآورده‌های لبنی نشان داده است [۲۵ و ۷]. به علت خاستگاه

6. Proteolytic  
7. Exopolysaccharid  
8. Starter culture  
9. Lipolytic  
10. Enterocin  
11. *Listeria monocytogenes*  
12. *Staphylococcus aureus*

1. *Enterococcus*  
2. Acid Lactic Bacteria  
3. *E. faecium*  
4. *E. faecalis*  
5. *E. durans*

## ۲-۲- بررسی ویژگی های تکنولوژیکی

### ۱-۲-۲- فعالیت لیپولیتیک

فعالیت لیپولیتیکی جدایه ها بر اساس ایجاد هاله توسط تکنیک کشت بر روی تری بوتیرین آگار<sup>۱</sup> بررسی گردید. فعالیت لیپولیتیک بر اساس هاله روشن ایجاد شده در اطراف پرگنه در نظر گرفته می شود. برای این منظور سویه هلدردمای ۳۷ درجه به مدت ۷ روز گرمخانه گذاری گردیدند. شعاع هاله در اطراف کلنی ها بر حسب میلی متر اندازه گیری شده و به عنوان یک واحد اختیاری جهت نشان دادن شدت فعالیت لیپولیتیک در نظر گرفته شد [۲۹].

### ۲-۲-۲- فعالیت اتولیتیک<sup>۲</sup>

رسوب سلولی حاصل از کشت شبانه با  $OD_{600} = 1-0/8$  در بافر پتاسیم فسفات ۵۰ مولار با  $pH = 6/5$  سانتریفوژ شده و تا  $OD_{600} = 0/8-0/6$  رقیق سازی شد. بعد از آن گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه طی ۴۸ ساعت صورت گرفت (۳۰). در نهایت میزان فعالیت اتولیتیکی به صورت کاهش درصد جذب در ۶۰۰ نانومتر بر اساس فرمول زیر اندازه گیری شد:

$$(A_0 - A_t) \times 100 / A_0$$

$A_0$  = جذب اولیه

$A_t$  = جذب ثانویه بعد از  $t$  زمان گرمخانه گذاری شده

بر اساس این فرمول، انتروکوکوس ها از نظر اتولیز شدن به صورت زیر درجه بندی می شوند (۳۱):

خوب = ۶۶-۳۳، نسبتاً خوب = ۳۴-۲۴ و ضعیف = ۲۲-۰

### ۲-۲-۳- فعالیت پروتولیتیک

سوسپانسیون انتروکوکوس در بافر پتاسیم فسفات ۵۰ مولار و با  $pH = 6/5$  تهیه گردید. از این سوسپانسیون، به مقدار دو میکرولیتر بر روی سطح اسکیم میلک آگار<sup>۲</sup> (۲٪ آگار و ۱۰٪ شیر پس چرخ) نقطه گذاری شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی-گراد به مدت ۴ روز انکوباسیون صورت گرفت. تشکیل هاله روشن در اطراف کلنی ها، نشاندهنده فعالیت پروتولیتیکی بود [۱۲].

غذایی باکتریوسین های تولیدی توسط انتروکوکوس ها و نقش آن ها در جلوگیری از رشد پاتوژن های غذایی مانند لیستریا، باعث شده تا پژوهشگران بر روی انتروکوکوس ها به عنوان باکتری های محافظ، تحقیقات وسیعی از مواد غذایی انجام دهند [۲۶ و ۲۷]. در نهایت ویژگی های تکنولوژیکی و باکتریوسینی انتروکوکوس ها منجر شده تا در گروه های سودمند میکروارگانیسم ها قرار بگیرند، به طوری که به آن ها اجازه بهره برداری ایمن به عنوان کشت آغازگر داده شود [۱].

پژوهش حاضر، ادامه مطالعه انجام شده پیشین با عنوان "بررسی وجود عوامل بیماری زا و مقاومت به آنتی بیوتیک انتروکوکوس های ایزوله شده از پنیر لیقوان" می باشد [۲۸]. در این مطالعه ویژگی های تکنولوژیکی و ضد میکروبی نژادهای انتروکوکوس فاسیوم زیرگونه فاسیوم جدا شده از پنیر لیقوان مورد ارزیابی قرار گرفته تا در صورت وجود خصوصیات مطلوب تکنولوژیکی و ضد میکروبی در صنعت تولید فرآورده های لبنی تخمیری مورد استفاده قرار گیرند.

## ۲- مواد و روش ها

### ۱-۲-۱- فعال سازی باکتری های نگهداری شده در

#### گلیسرول ۲۰٪

سویه های انتروکوکوس فاسیوم زیرگونه فاسیوم مورد بررسی توسط جغتایی و همکاران (۲۰۱۴) به روش مولکولی توسط توالی  $16S rRNA$  شناسایی شدند (جدول ۱) و همچنین آن ها گزارش کردند، که این سویه های مورد بررسی فاقد فاکتورهای بیماری زا هستند (جدول ۲) (۲۸). سویه های ایزوله شده بر روی محیط کشت M17 Agar در دمای ۳۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد، که در صورت مشاهده کلنی کوچک، گرد و شیری رنگ سویه مورد نظر فعال در نظر گرفته شد. سپس کلنی های فعال شده از نظر مشاهده میکروسکوپی، آزمون کاتالاز و رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفت.

1. Tri Botyryn Agar
2. Autolytic
3. Skim milk agar

**Table 1** Determination of Enterococcus species by Species Specific PCR (28)

Isolate Numbe	Name of Bacteria in 16S rRNA gene Sequencing	%Identify	Species Specific PCR Result
1	<i>E.faecium</i>	97	<i>faecium</i>
2	<i>E.faecium</i>	98	<i>faecium</i>
3	<i>E.faecium</i>	98	<i>faecium</i>
4	<i>E.faecium</i>	97	<i>faecium</i>
5	<i>E.faecium</i>	97	<i>faecium</i>

**Table 2** Gene presence and pathogenicity properties in 5 isolates tested (28)

Isolates	<i>VanA</i>	<i>VanB</i>	<i>gelE</i>	<i>asa1</i>	<i>Esp</i>	<i>ace</i>	<i>cpd</i>	<i>Gelatinase</i>	<i>Hemolysin</i>
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

شاخص به مدت ۱۲ الی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت وجود هاله‌های شفاف در اطراف نقاط تلقیح شده با *انتروکوکوس فاسیوم* نشان‌دهنده‌ی عدم رشد میکروارگانیسم‌های شاخص و در نتیجه خاصیت ضد باکتریایی ایزوله‌ها بود [۳۳].

**Table 3** Indicator microorganisms (33)

Number	Microorganism	ATCC
1	<i>S.aureus</i>	25923
2	<i>L.innocola</i>	33090
3	<i>E.coli</i>	25922

### ۲-۶- تولید اگزوپلی ساکارید

از سویه‌های فعال شده بر روی محیط روتینیوم رد میلک (RRM) که حاوی عصاره مخمر (۰/۵٪)، شیر پس چرخ (۱۰٪)، ساکاروز (۱٪)، آگار (۱/۵٪) و روتینیوم رد (۰/۰۸٪) بودند، کشت خطی انجام شد. در صورت ایجاد کلنی‌های سفید رنگ توسط سویه‌ها تولید اگزوپلی ساکارید تایید خواهد شد [۳۴].

### ۲-۷- مقاومت حرارتی

مقاومت سویه‌های موردنظر در دماهای ۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵، ۸۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ و ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌ها بعد از قرار گرفتن در آب گرم به مدت ۱۶ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و جذب سویه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد [۳۵].

### ۲-۴- قابلیت اسیدیفیکاسیون

برای بررسی قابلیت اسیدیفیکاسیون ابتدا ۱٪ حجمی-حجمی از سویه فعال شده در M17 broth ( $10^8$  CFU/ml)، به لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از شیر پس چرخ استریل (RSM10%W/V)، تلقیح گردیده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری شدند. pH و اسیدیته قابل تیتراسیون بلافاصله بعد از تلقیح (زمان صفر)، ۶ و ۲۴ ساعت مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. درجه اسیدیفیکاسیون با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۳۱].

$$\Delta pH = pH \text{ (at time 24h)} - pH \text{ (zero time)}$$

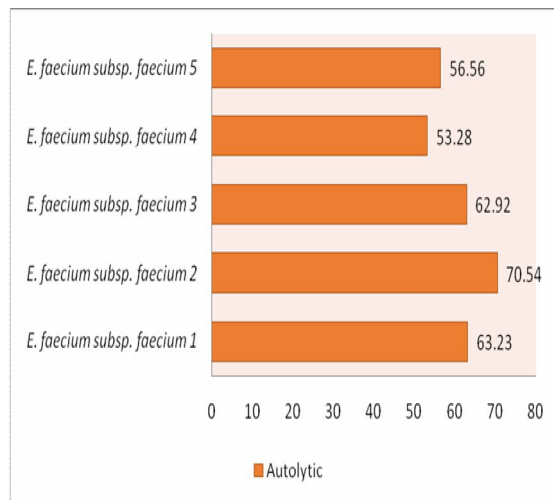
### ۲-۵- فعالیت ضد میکروبی

روش Lawn on the Spot

ابتدا ایزوله‌های *انتروکوکوس فاسیوم* بر روی محیط M17 Agar کشت خطی داده شد و سپس در دمای بهینه رشد سویه به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون صورت گرفت. سویه‌ها به محیط کشت BHI Broth انتقال گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ایجاد کدورت، به مقدار ۵ میکرولیتر بر روی سطح محیط کشت BHI Agar نقطه‌گذاری گردید و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد [۳۲].

پس از رشد سویه‌های *انتروکوکوس*، سطح محیط کشت توسط یک لایه آگار نرم (حدود ۱۰ سی سی) که به میزان ۰/۲۵ درصد با میکروارگانیسم‌های شاخص تلقیح شده بود، پوشانده شد. در ادامه پلیت‌ها در دمای رشد میکروارگانیسم‌های

طوری که سویه *انتروکوکوس فاسیوم* زیر گونه فاسیوم ۲ بالاترین میزان اتولیز ( $3/44 \pm 70/55$ ) را داشت.



**Fig 1** The autolysis of *E. faecium* strains in terms of reduction of the optical density unit (absorption at 600 nm).

در این راستا، فرانشی<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه بر روی پتانسیل تکنولوژیکی و زیستی باکتری‌های اسیدلاکتیک ایزوله شده از شیر گاو، نشان دادند که حداکثر سرعت و میزان فعالیت اتولیتیک متعلق به گونه *انتروکوکوس فکالیس* بود و گونه‌های *انتروکوکوس دورانس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس*<sup>۲</sup> نیز فعالیت اتولیز مناسبی داشتند [۱۲]. آیاد<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه بر روی جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک گزارش کردند، که فعالیت اتولیتیک سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک متفاوت بوده و به سه گروه خوب، متوسط و ضعیف تقسیم‌بندی شدند، به طوریکه *لاکتوباسیلوس*‌ها درجه اتولیز بالاتری (۹۶٪-۰) نسبت به *انتروکوکوسی*‌ها (۶۶٪-۰) و سویه‌های *لاکتوکوکوس* (۳۷٪-۱) نشان دادند [۳۱]. اسپری<sup>۴</sup> و همکاران (۲۰۱۶) نیز در ارزیابی فعالیت اتولیتیک *انتروکوکوس*‌ها مشاهده کردند که در بین ۷۲ سویه‌ی *انتروکوکوس* مورد بررسی، تنها ۱۰ سویه از *انتروکوکوس*‌ها فعالیت اتولیتیک بالا داشتند در حالی که ایزوله‌های ۵۱ و ۱۱ به ترتیب فعالیت پایین و عدم فعالیت اتولیتیک را نشان دادند [۲۲]. بنابراین با توجه به مطالعات فوق، فعالیت اتولیتیک

1. Franciosi
2. *Lactococcus lactis*
3. Ayad
4. *Lactobacillus*
5. Aspri

## ۲-۸- مقاومت به اسید

ابتدا pH محیط کشت سویه‌های مورد نظر با استفاده از اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال در pH ها ۳، ۳/۵، ۴، ۵ و ۶ تنظیم شده و به مدت ۱۶ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. در ادامه، جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد [۳۵].

## ۴- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

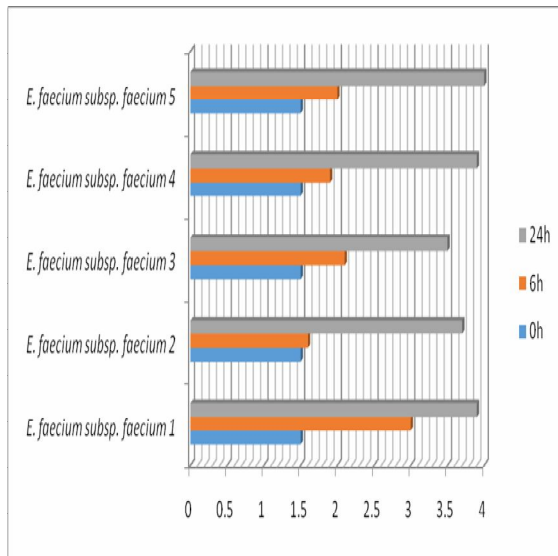
در این پژوهش، به منظور بررسی آزمون‌ها از مقایسه میانگین در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. اما برای آزمایش مقاومت به حرارت با سه متغیر سویه (*انتروکوکوس فاسیوم* زیر گونه فاسیوم ۱، *انتروکوکوس فاسیوم* زیر گونه فاسیوم ۲، *انتروکوکوس فاسیوم* زیر گونه فاسیوم ۳، *انتروکوکوس فاسیوم* زیر گونه فاسیوم ۴ و *انتروکوکوس فاسیوم* زیر گونه فاسیوم ۵)، دما (۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵، ۸۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد) و زمان (۱۵ و ۳۰ دقیقه) و آزمایش مقاومت به اسید با دو متغیر سویه (*انتروکوکوس فاسیوم* زیر گونه فاسیوم ۱، *انتروکوکوس فاسیوم* زیر گونه فاسیوم ۲، *انتروکوکوس فاسیوم* زیر گونه فاسیوم ۳، *انتروکوکوس فاسیوم* زیر گونه فاسیوم ۴ و *انتروکوکوس فاسیوم* زیر گونه فاسیوم ۵) و pH (۳، ۳/۵، ۴، ۵، ۶) از طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل با سه تکرار استفاده شد. آنالیز واریانس با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 22) و مقایسه میانگین نیز با استفاده از آزمون دانکن در سطح آماری ۰/۰۵ درصد به کمک نرم‌افزار MSTATC انجام شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

## ۵- نتایج و بحث

### ۵-۱- ارزیابی فعالیت اتولیتیک

فعالیت اتولیتیک، توانایی سویه‌ها در لیز سلولی و انتشار آنزیم‌های درون سلولی (نظیر لیپاز و پروتئاز) در طی رسیدگی پنیر است که یکی از ویژگی‌های مهم باکتری‌های اسیدلاکتیک محسوب می‌شود [۱۲]. مطابق شکل ۱، مطالعه‌ی فعالیت اتولیتیک نشان داد، که تمام سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* مورد بررسی فعالیت مناسبی ( $6/680 \pm 66/306$ ) داشتند؛ به

طبق طبقه‌بندی آریباس<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۰۹)، ایزوله‌ها بر حسب توانایی کاهش pH بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، به سه گروه تقسیم بندی می‌شوند: ۱) آن‌هایی که ظرفیت اسیدی بالا با کاهش pH بیش از ۲ واحد دارند؛ ۲) آن‌هایی که دارای ظرفیت اسیدی متوسط با قابلیت کاهش pH در محدوده ۲-۱/۵ واحد هستند و ۳) آن‌هایی که ظرفیت اسیدیته پایین با توانایی کاهش pH در کمتر از ۱/۵ واحد را دارند [۲۲ و ۳۷]. بر طبق این طبقه‌بندی، همه سویه‌های اتروکوکوس فاسیوم در این پژوهش، ظرفیت اسیدیته متوسط داشته و pH را تا ۲-۱/۵ واحد کاهش دادند (شکل ۳).



**Fig 3** The ability to produce acidification by *E. faecium* strains ( $\Delta$ pH).

طبق مطالعه پژوهشگران، اتروکوکوس فاسیوم فعالیت اسیدیته متوسط با کاهش pH در محدوده ۲-۱/۵ واحد برخوردار هستند، که سویه‌های اتروکوکوس فکالیس پایین‌ترین مقدار pH و بیشترین اسیدیته را داشته‌و به دنبال آن سویه‌های اتروکوکوس فاسیوم بوده است [۳۸ و ۱۴].

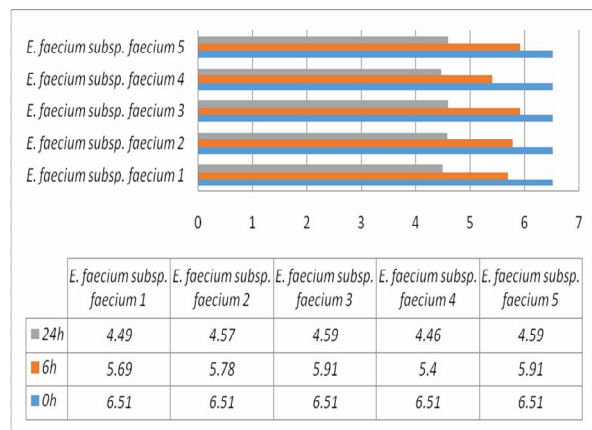
### ۳-۵- ارزیابی فعالیت لیپولیتیک

کشت‌های همراه، با توجه به ویژگی‌های دیگری نظیر فعالیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی نیز انتخاب می‌شوند، که فعالیت لیپولیتیک به‌عنوان یک فرآیند مهم در توسعه عطر و طعم و بافت فرآورده‌های لبنی نظیر پنیر می‌باشد (۲۹). این فرآیند توسط آنزیم لیپاز، تری‌گلیسریدها را هیدرولیز کرده و منجر به تولید ترکیبات عطر و طعم مانند متیل‌کتون، استرها و لاکتون‌ها

جهت آزادسازی بعضی از آنزیم‌های درون سلولی به‌عنوان یک صفت مطلوب در تولید بعضی از فرآورده‌های لبنی نظیر پنیر شناخته می‌شود. شدت اتولیز به نوع سویه وابسته است، زیرا در میزان فعالیت اتولیتیک سویه‌های یک گونه تفاوت وجود دارد. یکی از راه‌های سرعت بخشیدن تولید فرآورده‌های لبنی اضافه کردن کشت همراه می‌باشد، که انتخاب سویه‌های کشت همراه باید بر اساس پروفایل آنزیم‌ها و ویژگی‌های اتولیتیک صورت گیرد.

### ۵-۲- ارزیابی فعالیت اسیدیته

برای تولید نوشیدنی‌های لبنی تخمیری میزان تولید اسید یک فاکتور مهم می‌باشد، که از متابولیسم لاکتوز شیر ناشی شده و در ایجاد عطر و طعم فرآورده‌های تخمیری نقش دارند. کاهش pH، مانع رشد باکتری‌های غیرمطلوب از جمله باکتری‌های عامل فساد و پاتوژن‌زا می‌شود. یک باکتری مزوفیلیک مناسب با کاهش pH به تولید اسید توسط کشت آغازگر در شیر سرعت می‌بخشد. در این راستا، کوگان<sup>۲</sup> و همکاران (۱۹۹۷) مشاهده کردند که سویه‌ها میزان pH را از ۶/۶ به ۵/۳ در طی ۶ ساعت (۱/۳ واحد) کاهش دادند (۳۶). در این پژوهش، سویه اتروکوکوس فاسیوم زیرگونه فاسیوم ۴ با (۱/۱۱ واحد) و سویه اتروکوکوس فاسیوم زیرگونه فاسیوم ۱ با (۰/۸۲ واحد) به ترتیب بیشترین کاهش pH را بعد از ۶ ساعت نشان دادند (شکل ۲). همچنین اتروکوکوس فاسیوم زیرگونه فاسیوم ۲، اتروکوکوس فاسیوم زیرگونه فاسیوم ۳ و اتروکوکوس فاسیوم زیرگونه فاسیوم ۵ قادر به کاهش pH تا  $0.76 \pm 0.07$  واحد) بودند.



**Fig 2** The pH variations of *E. faecium* strains isolated from traditional cheese during 24 hours of heating.

1. Adjunct Culture
2. Cogan

3. Arribas

شده که نقش مهمی در هیدرولیز کازئین در طول آماده‌سازی پنیر ایفا می‌کنند [۴۲]. در این راستا، میزان فعالیت های پروتئاز و پپتیداز در *انتروکوکوس* ها پایین است و فعال‌ترین آن‌ها *انتروکوکوس فکالیس* می‌باشد [۱۶-۱۳]. طبق گفته پژوهشگران فعالیت پروتئولیتیک به نوع سویه و زمان وابسته است، بر این اساس سویه‌ای با فعالیت پروتئولیتیک، می‌تواند با گذشت زمان فعالیت بالاتری هم داشته باشد [۴۳].

فرانسی و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی بر روی ویژگی‌های تکنولوژیکی جدایه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک شیر گاو، مشاهده کردند فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌های اسید لاکتیک پایین بوده است که فقط ۸ سویه (لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس NS38، استافیلوکوکوس اورئوس V96، V98 و V99، *انتروکوکوس فکالیس* N4 و P343 و *انتروکوکوس دورانس* V25 و V1) قادر به ایجاد هاله در محیط کشت شیر پس چرخ بودند [۱۲]. اسپریو همکاران (۲۰۱۶) مشاهده کردند، که ۷۸٪ سویه‌های *انتروکوکوس* مورد بررسی، قادر به ایجاد هاله در محیط کشت شیر پس چرخ بودند و ۲۲٪ از سویه‌ها به دلیل عدم تشکیل هاله در محیط، قادر به فعالیت پروتئولیتیکی نبودند [۲۲]. در یک ارزیابی کلی، در این پژوهش به دلیل عدم تشکیل هاله بر روی محیط کشت شیر پس چرخ، سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* فاقد فعالیت پروتئولیتیک هستند. بنابراین فعالیت پروتئولیتیک به‌عنوان یک معیار انتخابی برای تولید شیرهای تخمیری گفته نمی‌شود، اما سویه‌هایی که قادر به فعالیت پروتئولیتیک هستند منجر به تشکیل پپتیدهایی با خواص زیستی مثل خواص ضد میکروبی و ضد فشارخون در طول تخمیر شیر می‌شوند [۴۴].

### ۵-۵- ارزیابی تولید اگزوپلی ساکارید (EPS)

تمام سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* ایزوله شده از پنیر سنتی در زمینه ارزیابی اگزوپلی ساکارید، قادر به تولید کلنی سفیدرنگ (شکل ۴) بر روی محیط کشت روتنیوم رد میلک (RRM) بودند. در نتیجه، توانایی تولید اگزوپلی ساکارید را دارند.

می‌شود و گزارش‌ها حاکی از آن است، که *انتروکوکوس فکالیس* بیشترین فعالیت لیپولیتیک را داشته و به دنبال آن *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس دورانس* بوده است [۷-۱۴]. به گفته پژوهشگران فعالیت آنزیم لیپاز با افزایش جرم مولکولی اسیدهای چرب، کاهش می‌یابد. اسیدهای چرب با جرم مولکولی پایین (C3, C4, C6, and C10) منجر به افزایش تولید آنزیم لیپاز شده و در مقابل اسیدهای چرب با جرم مولکولی بالا (C12, C14, C16, C18, and C18:2) تولید آنزیم لیپاز را مهار می‌کند (۳۹, ۱۵). نتایج بدست آمده از مطالعه محققان در زمینه ارزیابی لیپولیتیک با استفاده از محیط تری بوتیرین آگار، فعالیت پایین لیپولیتیک در *انتروکوکوس* ها را گزارش کردند [۴۰ و ۲۹ و ۲۲ و ۱]. از طرفی در مطالعه ماسدو و مالکاتا (۱۹۹۷)، سویه‌ای از *انتروکوکوس فاسیوم* توانسته به میزان بیشتری چربی شیر را نسبت به لاکتوکوکوس لاکتیس هیدرولیز کند [۲۴]. لیپولیز در پنیرهای ایتالیایی و رگه آبی مطلوب است، زیرا هیدرولیز کوچکی از چربی شیر منجر به بهبود عطر و طعم شده بدون اینکه طعم تلخ ایجاد کند، اما در مقابل لیپولیز در شیرهای تخمیری نامطلوب است [۴۱]. بنابراین، پژوهش ما در مقایسه با دیگر مطالعات در زمینه ارزیابی فعالیت لیپولیتیک، هیچ‌کدام قادر به هیدرولیز تری بوتیرین آگار نبوده و هاله‌ایی ایجاد نکردند. در نتیجه، هیچ‌کدام از سویه‌های مورد بررسی فعالیت لیپولیتیک نداشتند.

### ۵-۴- ارزیابی فعالیت پروتئولیتیک

به گفته پژوهشگران تخریب کازئین در ارتباط با فعالیت پروتئولیتیک و پپتیدولیتیک میکروارگانیزم‌ها، یک نقش تصدیق‌کننده در رسیدن پنیر و بافت پنیر ایفا می‌کنند [۷، ۱۳، ۳]. علاوه بر این، برخی از پپتیدها به تشکیل عطر و طعم مطلوب در محصول کمک می‌کنند و برخی پپتیدهای دیگر منجر به عطر و طعم نامطلوب<sup>۲</sup> می‌شوند. علاوه بر آنزیم‌های پروتئولیتیک بومی شیر و آنزیم رنینی که در انعقاد پروتئین نقش دارند، پروتئاز و پپتیدازهای داخل سلولی پس از لیز شدن دیواره سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک، در دلمه آزاد

1. Macedo and Malcata  
2. Off-flavoure

3. Skim Milk

یک فرآورده لبنی تخمیری تونسی به شرایط اسیدی در pH های ۱ تا ۵ در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند، بقای سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* در pH های ۳، ۴ و ۵ بیشتر بوده است و در مقابل بقای سویه‌ها در شرایط اسیدی بالاتر pH های ۱ و ۲ با افزایش زمان و گرمخانه‌گذاری، کاهش پیدا کرده است [۴۵]. همچنین احمدووا<sup>۳</sup> در مطالعه خود بر روی *انتروکوکوس فاسیوم* AQ71 جدا شده از پنیر، گزارش کرد که سویه مورد مطالعه در محیط MRS Broth با مقدار pH های ۷ تا ۱۱ به خوبی رشد کرده، در pH=۱۳ رشد آهسته‌تر بوده و در pH های ۳ و ۴ رشد مشاهده نشده است [۴۶]. بنابراین، مقاومت سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* مورد بررسی در شرایط اسیدی pH های ۳، ۳/۵، ۴، ۵ و ۶ نشان دادند، که رشد سویه‌ها با کاهش pH و افزایش شرایط اسیدی با استفاده از HCL در محیط MRS Broth، کاهش پیدا کرده است، به طوری که در pH های ۶ و ۵، رشد به خوبی صورت گرفته، در pH=۴ رشد بسیار کند شده و در pH های ۳ و ۳/۵ رشدی صورت نگرفته است (شکل ۵). بالاترین مقاومت به اسید را سویه *انتروکوکوس فاسیوم* زیرگونه *فاسیوم* ۴ داشته و بعد از آن به ترتیب سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* زیر گونه فاسیوم ۱، *انتروکوکوس فاسیوم* زیر گونه فاسیوم ۲، *انتروکوکوس فاسیوم* زیرگونه فاسیوم ۳ و *انتروکوکوس فاسیوم* زیرگونه فاسیوم ۵، مقاومت به شرایط اسیدی را نشان دادند. بنابراین، افزایش شرایط اسیدی اختلاف آماری معنی‌داری در کاهش مقاومت سویه‌ها داشته است. مقاومت به شرایط اسیدی (pH پایین) به‌عنوان یکی از ویژگی‌های مهم باکتری‌های اسید لاکتیک در نظر گرفته می‌شود، زیرا توانایی آن‌ها در بقاء و رشدشان در روده کوچک را نشان می‌دهد [۴۷ و ۴۸].

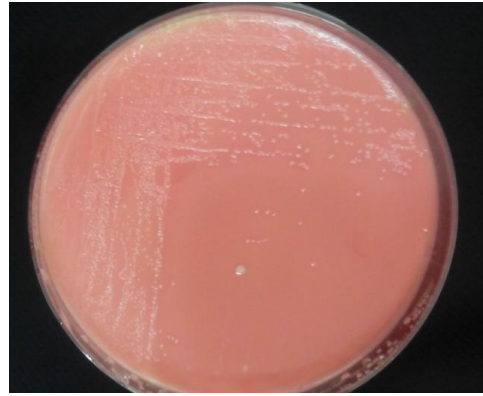


Fig 4 Exopolysaccharide production on the RRM.

طبق مطالعه آسپری و همکاران ۳۶٪ از سویه‌های *انتروکوکوس* مورد بررسی توانایی تولید اگزوپلی ساکارید داشتند، به طوری که تولید اگزوپلی ساکارید را به‌عنوان یک مزیت معرفی کردند، زیرا منجر به احساس دهانی بهتر (مانند ویسکوزیته بهتر، بافت نرم و حالت خامه‌ایی<sup>۱</sup>) می‌شود. به‌عنوان مثال، سویه‌های تولید کننده اگزوپلی ساکارید به‌عنوان کشت آغازگر در تولید پنیرهای اسکاندیناوی به منظور ایجاد بافت بهتر (بافت طنابی) استفاده شده است. علاوه بر این، باکتری‌های تولید کننده اگزوپلی ساکارید را می‌توان جایگزین هیدروکلئیدها کرد تا در تولید فرآورده‌های تخمیری به کاهش هزینه‌ها کمک کرد. به غیر از نقش آن‌ها در بهبود رئولوژی فرآورده‌های لبنی تخمیری، باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده‌ها اگزوپلی ساکارید احتمالاً یک نقش محافظتی در برابر عوامل محیطی مثل خشک شدن، فاگوسیتوز، حمله فاژها، استرس اسمزی، آنتی‌بیوتیک و یا ترکیبات سمی بازی می‌کند [۲۱] و همچنین تولید اگزوپلی ساکارید یک صفت مطلوب برای باکتری‌های پروبیوتیک در کلونیزه شدن آن‌ها در دستگاه گوارش است [۲۲].

#### ۵-۶- ارزیابی مقاومت به شرایط اسیدی

طبق بررسی عامل<sup>۲</sup> و همکاران در زمینه ارزیابی مقاومت سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* MMRA جدا شده از

3. Ahmadova

1. Creaminess  
2. Amel

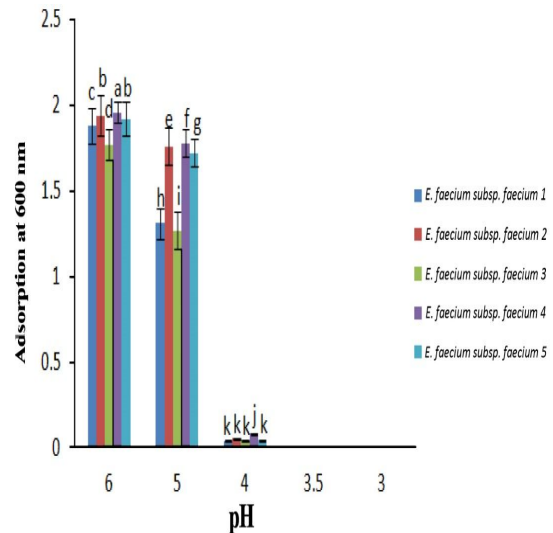


لیستریا، انتروکوکوس و استافیلوکوکوس اورئوس نشان دادند و همچنین یکی از سویه‌ها در برابر اثرشیاکلی فعال بوده است [۵۰]. نتایج بررسی سویه‌های انتروکوکوس ایزوله شده از کفیر توسط کارازی<sup>۵</sup> و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که سویه‌های انتروکوکوس دورانس قادر به مهار پاتوژن‌های گرم مثبت و منفی بودند [۵۱].

موراندی<sup>۶</sup> و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی ویژگی‌های ژنوتیپی، فنوتیپی و تکنولوژیکی جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک، گزارش کردند فقط سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم قادر به مهار لیستریا مونوسیوتونز بوده و هاله‌ایی به قطر ۱۴ میلی‌متر ایجاد کردند و پنج ایزوله (استرپتوکوکوس<sup>۷</sup>، سویه از لاکتوباسیلوس دلبروکی<sup>۸</sup> و لاکتوباسیلوس فرمتوم<sup>۹</sup>) فعالیت آنتاگونیستی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس (۱۱-۸ میلی‌متر) نشان دادند [۵۲]. در پژوهش ما در زمینه ارزیابی فعالیت ضد میکروبی، سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم مورد بررسی قدرت بازدارندگی در برابر باکتری‌های عامل فساد و پاتوژن‌ها نظیر لیستریا اینوکوا<sup>۱</sup>، استافیلوکوکوس اورئوس و اثرشیاکلی نشان ندادند.

#### ۵-۸- ارزیابی مقاومت حرارتی

حضور انتروکوکوسی‌ها در شیر پاستوریزه به دلیل مقاومت آن‌ها در دمای ۶۲/۸ درجه به مدت ۳۰ دقیقه می‌باشد، گسترش و تداوم انتروکوکوس‌ها در طول رسیدن فرآورده‌های لبنی به طبیف گسترده دمایی [۱۰-۴۵]. مقاومت بالا به حرارت، مقاومت به pH در محدوده ۹/۶ - ۴ و نمک (۶/۵٪ NaCl) نسبت داده شده است [۷]. انتروکوکوس‌ها ممکن است، به طور طبیعی در کشت آغازگر وجود داشته باشند. کشت آغازگر شیر معمولاً از باکتری‌های اسید لاکتیک گرما دوست تشکیل شده است، که وجود انتروکوکوسی‌ها به طور طبیعی در کشت آغازگر شیر به دلیل مقاومت حرارتی بالا و ماهیت گرمادوستی آن‌ها می‌باشد. در واقع، کشت آغازگر طبق یک فرآیند سنتی با پاستوریزه کردن شیرخام با کیفیت مناسب و انکوباسیون در دمای ۴۲-۴۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲-۱۵ ساعت ایجاد می‌شود. بنابراین، انتخاب طبیعی باکتری‌های اسید لاکتیک به



**Fig 5** The resistance of *E. faecium* strains to acidic conditions (low pH) in terms of optical density unit (absorbance at 600 nm).

The same letters have no significant difference at the level of ( $P < 0.05$ ).

#### ۵-۷- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی

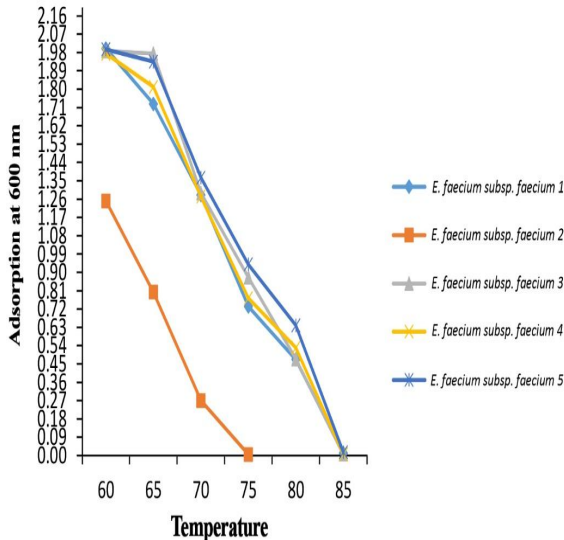
حضور انتروکوکوس‌های تولیدکننده باکتریوسین در فرآورده‌های تخمیری، اثر بازدارندگی بر باکتری‌های عامل فساد و بیماری‌زا مانند برخی از لاکتوباسیلوس‌ها دارد، هم‌ینطور انتروکوکوس‌ها به خصوص انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس دورانس از جهت فعالیت‌های لیپولیتیک، پروتئولیتیک و تجزیه سیترات نقش به‌سزایی در ایجاد عطر و طعم فرآورده‌های تخمیری ایجاد می‌کنند، اما انتروکوکوس‌ها منجر به بیماری‌هایی چون اندوکاردیت<sup>۱</sup>، باکترمی<sup>۲</sup> و عفونت‌های ادراری می‌شوند. مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های متعدد از جمله ونکومایسین<sup>۳</sup> و هم‌ینطور وجود فاکتورهای تهاجمی باعث شده تا در صورت استفاده از انتروکوکوس‌ها در فرآورده‌های تخمیری، اثرات منفی آن‌ها در سلامت مصرف‌کننده مورد بررسی قرار گیرد [۴۹ و ۲۵].

بلقاسم<sup>۴</sup> و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند، که در زمینه ارزیابی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم ایزوله شده از گوشت تخمیر شده تونسی، سویه‌هایی از انتروکوکوس فاسیوم فعالیت ضد میکروبی در برابر چندین باکتری عامل فساد و بیماری‌زا از جمله

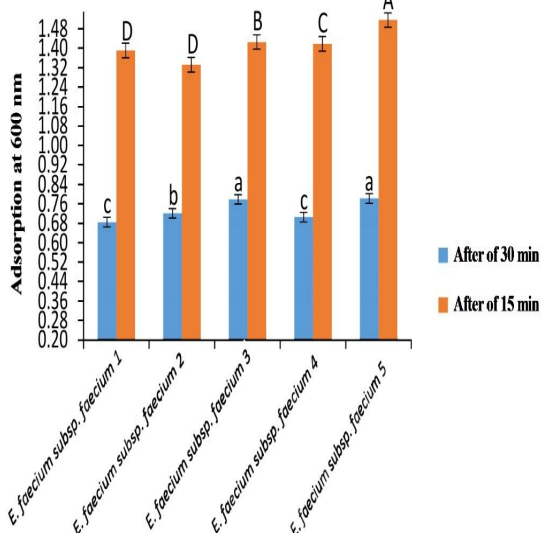
5. Carasi  
6. Morandi  
7. *Streptococcus*  
8. *L.delbrucki*  
9. *L.fermentum*

1. Endocarditis  
2. Bactermia  
3. Vancomycin  
4. Belgacem

که بین تمامی دماها تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ) و با افزایش دما، مقاومت سویه‌ها به دما کاهش یافته است که بیشترین مقاومت را سویه *انتروکوکوس فاسیوم* زیرگونه *فاسیوم* ۵ نشان داده است. با توجه به شکل ۶ و ۷، سویه‌ها در دماهای ۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد طی ۱۵ دقیقه و در دماهای ۶۰، ۶۵ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد طی ۳۰ دقیقه مقاومت مناسبی به دما داشتند، ولی در دماهای بالاتر (۸۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد) غیر فعال شدند.



**Fig 6** The resistance of *E. faecium* strains to the temperature in terms of optical density unit (absorption at 600 nm).



**Fig 7** shows a significant difference between 15 and 30 minutes. The same letters indicate no significant difference at the level ( $P < 0.05$ ). The big letters indicating the differences between the strains at 15 minutes and lower letters indicating the difference in strain in 30 minutes.

استریتوکوکوس ترموفیلوس<sup>۱</sup> و *انتروکوکوس* ها گرمادوست و مقاوم به حرارت تعلق می‌گیرد [۵۳].

بررسی کیرنز<sup>۲</sup> و همکاران (۱۹۹۵) در زمینه ارزیابی مقاومت به حرارت سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* در دماهای ۶۵، ۷۱، ۷۵ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه گزارش کردند، که تمام سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه و برخی سویه‌ها در دماهای ۷۱، ۷۵ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای سه دقیقه زنده باقی ماندند. همچنین آن‌ها گزارش کردند، که تمام جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* نیز در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۷۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه زنده باقی ماندند [۵۴]. برادلی و فراسی<sup>۳</sup> (۱۹۹۶) در مطالعه بر روی مقاومت شیمیایی و حرارتی *انتروکوکوس* ها گزارش کردند، که تنها یک نوع سویه کلینیکی (NCTC) بالاترین مقاومت را نشان داده به طوری که در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در عرض ۱۰ دقیقه، دمای ۷۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه زنده ماندند. در صورتی که تمام سویه‌های بالینی به غیر از سویه‌های حساس به ونکومایسین، مقاومت متفاوتی نشان دادند. سه تا از سویه‌ها در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای بیشتر از ۳ دقیقه زنده ماندند، که این سویه‌ها مقاوم به ونکومایسین بودند [۵۵]. و همچنین مطالعه دینگ و شاه<sup>۴</sup> (۲۰۰۷) در زمینه ارزیابی مقاومت به حرارت روی باکتری‌های پروبیوتیک میکروکپسوله و آزاد با در معرض قرار دادن دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت مشاهده کردند، که در حرارت ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه بقای باکتری‌های پروبیوتیک میکروکپسوله بهتر از باکتری‌های پروبیوتیک آزاد بوده است. در نتیجه میکروکپسوله کردن باکتری‌های پروبیوتیک بقای بهتری در مقایسه با باکتری‌های پروبیوتیک آزاد داشته است [۵۶].

با توجه به تحقیقات صورت گرفته *انتروکوکوس* ها مقاومت حرارتی مناسبی داشته، به طوری که در پاستوریزاسیون شیر زنده می‌مانند و می‌توان به‌عنوان کشت همراه از *انتروکوکوس* ها جهت تخمیر فرآورده‌های لبنی استفاده کرد. در این پژوهش، نتایج مربوط به مقاومت سویه‌ها در دماهای مختلف نشان داد،

1. *S. thermophilus*
2. Kearns
3. Bradley and Fraise
4. Ding and Shah

## ۶- نتیجه گیری

سویه‌های اتروکوکوس فاسیوم زیر گونه فاسیوم به روش مولکولی توسط جغتایی و همکاران (۲۰۱۴) از پنیر سنتی لیقوان ایزوله گردید و توسط توالی 16S rRNA شناسایی شدند و همچنین نتایج حاکی از آن است، که سویه‌های مورد بررسی فاقد فاکتورهای بیماری‌زا نظیر ژن مقاومت به ونکومایسین (*vanA* و *vanB*)، ژلاتیناز (*gelE*)، پروتئین سطحی اتروکوکوسی (*esp*)، فاکتور تجمعی (*asal*)، فرمون‌های جنسی (*cpd*)، عامل اتصال به کلاژن (*ace*) هستند [۲۸]. در این پژوهش، بررسی ویژگی‌های تکنولوژیکی و ضد میکروبی سویه‌های اتروکوکوس فاسیوم جدا شده از پنیر سنتی لیقوان نشان داد، که تمامی آن‌ها در برابر باکتری‌های عامل فساد و بیماری‌زا از جمله لیستریا اینوکوا، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس فعالیت ضد میکروبی نشان ندادند. سویه‌ها قادر به تولید آگزوپلی ساکارید بوده و از فعالیت اتولیتیک مناسب و فعالیت اسیدیفیکاسیون برخوردار بودند در حالی که فعالیت لیپولیتیک و پروتئولیتیک نشان ندادند. علاوه بر این، سویه‌ها مقاومت به اسید تا  $\text{pH} = 4$  و مقاومت حرارتی تا دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نشان دادند به طوری که در پاستوریزاسیون شیر زنده می‌مانند. بنابراین، با توجه به ویژگی‌های تکنولوژیکی مناسب (نظیر فعالیت اسیدیفیکاسیون، مقاومت به دما، مقاومت به شرایط اسیدی، فعالیت اتولیتیک و تولید آگزوپلی ساکارید) سویه‌های مورد بررسی، می‌توان از آن‌ها به‌عنوان کشت همراه جهت تولید نوشیدنی‌های تخمیری فرآورده‌های لبنی استفاده کرد.

## ۷- منابع

- [4] Schleifer K, Kilpper-Bälz R. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of *streptococci*, *enterococci* and *lactococci*: a review. *Systematic and Applied Microbiology*. 1987;10(1):1-19.
- [5] Stackebrandt E, Teuber M. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 1988;70(3):317-24.
- [6] Hardie J, Whiley R. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology*. 1997;83(S1).
- [7] Giraffa G. Functionality of *enterococci* in dairy products. *International Journal Of Food Microbiology*. 2003;88(2-3):215-22.
- [8] Franz CM, Holzapfel WH, Stiles ME. *Enterococci* at the crossroads of food safety? *International Journal Of Food Microbiology*. 19.24-1;(1)47;99
- [9] Gelsomino R, Vancanneyt M, Condon S, Swings J, Cogan T. *Enterococcal* diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *International Journal Of Food Microbiology*. 2001;71(2-3):177-88.
- [10] Barouei J, Karbassi A, Ghodduzi HB, Mortazavi A. Lactic Microflora Present in Liqvan Ewes' Milk Cheese. *International Journal Of Food Properties*. 2008;11(2):407-14.
- [11] Edalatian M, Habibi M, Mortazavi S, Nasiri M, Basami M, Hashemi M. Isolation and identification the indigenous lactic flora from Lighvan, as an Iranian raw milk cheese from milk to ripened cheese. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 2010;68:1346-51.
- [12] Franciosi E, Settanni L, Cavazza A, Poznanski E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*. 2009;19(1):3-11.
- [13] Arizcun C, Barcina Y, Torre P. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *International Journal Of Food Microbiology*. 1997;38(1):17-24.
- [14] Sarantinopoulos P, Andrighetto C, Georgalaki MD, Rea MC, Lombardi A, Cogan TM, et al. Biochemical properties of *enterococci* relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*. 2001;11(8):621-47.
- [15] Dovat A, Reinbold G, Hammond E, Vedamuthu E. Lipolytic and proteolytic activity of *enterococci* and lactic group *streptococci* isolated from young Cheddar
- [1] Moreno MF, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of *enterococci* in food and health. *International Journal Of Food Microbiology*. 2006;106(1):1-24.
- [2] Klein G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of *enterococci* from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal Of Food Microbiology*. 2003;88(2):123-31.
- [3] Franz CM, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. *Enterococci* as probiotics and their implications in food safety. *International Journal Of Food Microbiology*. 2011;151(2):125-40.

- [26] Sarantinopoulos P, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2002;76(1-2):93-105.
- [27] Sulzer G, Busse M. Growth inhibition of *Listeria* spp. on Camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. *International Journal of Food Microbiology*. 1991;14(3-4):287-96.
- [28] Joghataei M. Investigation of pathogenicity and antibiotic resistance in isolated *enterococci* from lighvan cheese. 2014; Master's thesis, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.
- [29] Morandi S, Brasca M, Andrighetto C, Lombardi A, Lodi R. Technological and molecular characterisation of *enterococci* isolated from north-west Italian dairy products. *International Dairy Journal*. 2006;16(8):867-75.
- [30] Mora D, Musacchio F, Fortina M, Senini L, Manachini P. Autolytic activity and pediocin - induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *Journal of Applied Microbiology*. 2003;94(4):561-70.
- [31] Ayad E, Nashat S, El-Sadek N, Metwaly H, El-Soda M. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology*. 2004;21(6):715-25.
- [32] Edalatian MR. Identification of lactic flora of raw milk cheeses using culture-based methods and molecular methods. 2013;Ph.D. thesis, Faculty of Agriculture, University of Tehran.
- [33] Alegría Á, Delgado S, Rocés C, López B, Mayo B. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International Journal Of Food Microbiology*. 2010;143(1):61-6.
- [34] Mora D, Fortina M, Parini C, Ricci G, Gatti M, Giraffa G, et al. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *Journal of Applied Microbiology*. 2002;93(2):278-87.
- [35] Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E, Kotzekidou P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat science*. 2003;65(2):859-67.
- cheese. *Journal of Milk and Food Technology (JMFT)*. 1970;33(9):۲۶۵:(
- [16] Tsakalidou E, Manolopoulou E, Kabaraki E, Zoidou E, Pot B, Kersters K, et al. The combined use of whole-cell protein extracts for the identification (SDS-PAGE) and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*. 1994;17(3):444-58.
- [17] Durlu - Ozkaya F, Xanthopoulos V, Tunail N, Litopoulou - Tzanetaki E. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*. 2001;91(5):861-70.
- [18] Hagrass A, Fayed E, Aly A, El - Samragy Y. Growth characteristics of *enterococci* isolated from Laban Rayeb. *Food/Nahrung*. 1991;35(2):209-13.
- [19] Giraffa G, Gatti M, Carminati D, Neviani E, editors. *Biochemical and metabolic characteristics of strains belonging to Enterococcus genus isolated from dairy products*. Proceedings of the Congress on Biotechnology and Molecular Biology of Lactic Acid Bacteria for the Improvement of Foods and Feeds Quality, Naples, February; 1993.
- [20] Suzzi G, Lombardi A, Lanorte M, Caruso M, Andrighetto C, Gardini F. Characterization of autochthonous *enterococci* isolated from Semicotto Caprino Cheese, a traditional cheese produced in Southern Italy. *J Appl Microbiol*. 2000;8:۲۴-۹:۲۶۷
- [21] Patel A, Prajapat J. Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advances in Dairy Research*. 2013:1-8.
- [22] Aspri M, Bozoudi D, Tsaltas D, Hill C, Papademas P. Raw donkey milk as a source of *Enterococcus* diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control*. 2017;73:81-90.
- [23] Parente E, Cogan T. Starter cultures: general aspects. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 2004;1:123-48.
- [24] Macedo AC, Malcata FX. Role of adventitious microflora in proteolysis and lipolysis of Serra cheese: preliminary screening. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*. 1997;205(1):25-30.
- [25] Giraffa G. *Enterococcal* bacteriocins: their potential as *anti-Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiology*. 1995;12:291-9.

- Azerbaijani Motal cheese. Food Control. 2013;30(2):631-41.
- [47] Minelli EB, Benini A, Marzotto M, Sbarbati A, Ruzzenente O, Ferrario R, et al. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. International Dairy Journal. 2004;14(8):723-36.
- [48] Walker DK, Gilliland SE. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*1. Journal of Dairy Science. 1993;76(4):956-61.
- [49] TUNCER BÖ, Ay Z, Tuncer Y. Occurrence of enterocin genes, virulence factors, and antibiotic resistance in 3 bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish tulum cheese. Turkish Journal of Biology. 2013;37(4):443-9.
- [50] Belgacem ZB, Abriouel H, Omar NB, Lucas R, Martínez-Canamero M, Gálvez A, et al. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. Food Control. 2010;21(4):462-70.
- [51] Carasi P, Jacquot C, Romanin DE, Elie A-M, De Antoni GL, Urdaci MC, et al. Safety and potential beneficial properties of *Enterococcus* strains isolated from kefir. International Dairy Journal. 2014;39(1):193-200.
- [52] Morandi S, Brasca M, Lodi R. Technological, phenotypic and genotypic characterisation of wild lactic acid bacteria involved in the production of Bitto PDO Italian cheese. Dairy Science & Technology. 2011;91(3):341-59.
- [53] Giraffa G, Carminati D, Neviani E. *Enterococci* isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. Journal of Food Protection. 1997;60(6):732-8.
- [54] Kearns A, Freeman R, Lightfoot N. Nosocomial *enterococci*: resistance to heat and sodium hypochlorite. Journal of Hospital Infection. 1995;30(3):193-9.
- [55] Bradley C, Fraise A. Heat and chemical resistance of *enterococci*. Journal of Hospital Infection. 1996;34(3):191-6.
- [56] Ding W, Shah N. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. Journal Of Food Science. 2007;72(9)
- [36] Cogan TM, Barbosa M, Beuquier E, Bianchi-Salvadori B, Cocconelli PS, Fernandes I, et al. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. Journal of Dairy Research. 1997;64(3):409-21.
- [37] Nieto - Arribas P, Seseña S, Poveda J, Palop L, Cabezas L. Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in processing of artisanal Manchego cheese. Journal of Applied Microbiology. 2009;107(5):1505-17.
- [38] Nieto-Arribas P, Seseña S, Poveda JM, Chicón R, Cabezas L, Palop L. *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: biodiversity, technological and safety aspects. Food Microbiology. 2011;28(5):891-9.
- [39] Chander H, Ranganathan B. Role of some fatty acids on the growth and lipase production by *Streptococcus faecalis*. Journal of Food Science. 1979;44(5):1566-7.
- [40] Serio A, Chaves-López C, Paparella A, Suzzi G. Evaluation of metabolic activities of *enterococci* isolated from Pecorino Abruzzese cheese. International Dairy Journal. 2010;20(7):459-64.
- [41] Herrero M, Mayo B, Gonzalez B, Suarez J. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. Journal of Applied Microbiology. 1996;81(5):565-70.
- [42] Wilkinson MG, Guinee TP, O'Callaghan DM, Fox PF. Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. Journal of Dairy Research. 1994;61(02):249-62.
- [43] de Mendoza MSC, Meinardi C, Simonetta AC. Actividad Caseinolítica Endocelular de *Enterococos para Starters Lácticos*. Revista Argentina de Lactología. 1989;1(1):45-54.
- [44] Korhonen H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. Journal of Functional Foods. 2009;1(2):177-87.
- [45] Rehaiem A, Belgacem ZB, Edalatian MR, Martínez B, Rodríguez A, Manai M, et al. Assessment of potential probiotic properties and multiple bacteriocin encoding-genes of the technological performing strain *Enterococcus faecium* MMRA. Food Control. 2014;37:343-50.
- [46] Ahmadova A, Todorov SD, Choiset Y, Rabesona H, Zadi TM, Kuliyevev A, et al. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from

## Technological and antimicrobial characteristics of nonpathogenic strains *Enterococcus faecium* subsp. *faecium* isolated from traditional cheese

Izadimehr, Z.<sup>1</sup>, Yavarmanesh, M.<sup>2\*</sup>, Habibi, M. B.<sup>3</sup>, Edalatian Dovom, M. R.<sup>4</sup>

1. Master of Science in Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
4. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 2018/01/27 Accepted: 2018/09/08)

In this study, technological and antimicrobial properties of *E. faecium* strains isolated from traditional cheese were evaluated. The investigation of the technological properties of *E. faecium* strains showed that all of them were able to produce exopolysaccharides due to the production of a white colony on the ruthenium red milk medium. Autolytic activity of these strains was investigated by reducing of absorption percentage at 600 nm. The most activity was shown by *E. faecium* subsp. *faecium* (strain 2). Strains also had acidification activity after 24 hours of incubation due to a pH decrease of 1.5 to 2.5. The antimicrobial activity was evaluated using Lawn on the Spot method, which did not show antimicrobial activity against pathogenic bacteria such as *L. innocua*, *E. coli* and *S. aureus*. The results of resistance of the strains to acidic and temperature conditions were significant ( $P < 0.05$ ), so that the *E. faecium* subsp. *faecium* (strain 4) showed the highest resistance to acidic condition and the *E. faecium* subsp. *faecium* (strain 5) showed the highest temperature resistance. As a result, this study showed that due to suitable technological properties, *E. faecium* subsp. *faecium* can be used as a co-culture in fermented dairy products.

**Keywords:** *E. faecium*, Technological characteristics, Antimicrobial activity

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: yavarmanesh@um.ac.ir