مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

ارزیابی شاخص های بیماری زایی و خواص تکنولوژیکی جدایه های *انتروکوکوس فاسیوم* حاصل از پنیر های سنتی ایران

تکتم فرخنده[۱]، مسعود یاورمنش[۲*]، فریده طباطبایی یزدی[۳]، محمدرضا عدالتیان دوم[۴]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

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

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

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

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۷

کلمات کلیدی:

پنیر سنتی،

انتروکوکوس فاسیوم،

بیماری زایی،

خواص تکنولوژیکی.

DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3

* مسئول مکاتبات:

yavarmanesh@um.ac.ir

چکیده

اخیرا به انتروکوکوس ها برای استفاده به عنوان پروبیوتیک در فراورده های لبنی توجه خاصی شده است. تمامی این ویژگی های مطلوب محرکی برای تولید کنندگان فرآورده های لبنی جهت استفاده از انتروکوکوس های ذاتی جدا شده از فرآورده های لبنی نظیر پنیر لیقوان، می باشد.علی رغم داشتن تمامی این ویژگی ها انتروکوکوس ها به عنوان GRAS شناخته نمی شوند و حضور آن ها در فراورده های غذایی نشانه ای از آلودگی مدفوعی می باشد. هدف از این پژوهش بررسی انتروکوکوس های جدا شده از پنیر لیقوان و کوزه به لحاظ دارا بودن شاخص های بیماری زایی به منظور تایید بی خطر بودن برای مصرف کننده و در نهایت بررسی امکان به کارگیری آنها به عنوان آغازگر و یا کمک آغازگر در فرآورده های لبنی به ویژه پنیرها می باشد. بر این اساس، ۵۷ جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* از پنیر های سنتی ایران از نظر وجود ژن های بیماری زایی بررسی شدند که در نهایت ۲۳ جدایه فاقد هرگونه ژن بیماری زایی بودند. سپس خواص تکنولوژیکی این جدایه ها از قبیل خاصیت اسیدیفیکاسیون، پروتئولیتیک، لیپولیتیک، اتولیتیک، مقاومت حرارتی و اسیدی و تولید اگزوپلی ساکارید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که از بین ۲۳ سویه مورد بررسی ۱۹ جدایه دارای فعالیت ضد میکروبی در برابر باکتری های بیماری زای شاخص، ۱۶ سویه قادر به تولید اگزوپلی ساکارید و ۲۰ جدایه دارای خاصیت اسیدیفیکاسیون متوسط بودند. بیشترین فعالیت پروتئولیتیک و لیپولیتیک به ترتیب مربوط به سویه های c18و c16 بود و سویه LR78 بیشترین مقاومت اسیدی و حرارتی را از خود نشان داد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

۱- مقدمه

باکتری های جنس انتروکوکوس کوکسی های گرم مثبت و کاتالاز منفی که در همه جا حضور داشته و اغلب در تعداد زیادی از سبزیجات، مواد گیاهی و مواد غذایی خصوصا با منشا حیوانی از قبیل فرآورده های لبنی وجود دارند[۱]. این باکتری ها غالبا در تعداد زیادی از فرآورده های لبنی و سایر مواد غذایی تخمیری نیز وجود دارند. آن ها همچنین جزئی از فلور میکروبی طبیعی دستگاه گوارش برخی از پستانداران از جمله انسان ها هستند. حضور انتروکوکوس ها در فرآورده های لبنی از مدت ها قبل به عنوان شاخص شرایط بهداشتی نامناسب در طی تولید و فرآوری شیر در نظر گرفته می شود. با این حال انتروکوکوس ها تاریخچه طولانی برای استفاده ایمن در مواد غذایی دارند. علاوه براین تعداد قابل توجهی از گونه های مختلف جنس انتروکوکوس دارای ویژگی های بیوتکنولوژیکی جالبی از قبیل تولید باکتریوسین و خواص پروبیوتیکی هستند [۲]. سازمان خوار و بار و کشاورزی ملل متحد (FAO) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) در سال ۲۰۰۲ توصیه کردند که الگو های مقاومت به عوامل ضد میکروبی و خصوصیات فرصت طلبی ویروسی برای اطمینان از ایمن بودن گونه های انتروکوکوس مورد استفاده به عنوان آغازگر یا پروبیوتیک، باید مورد آزمون قرار بگیرند [۳].

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[٤]. انتروکوکوس کاربردهای مهمی در صنعت لبنیات دارد و در تکوین خصوصیات ارگانولپتیکی در طی رسیدن بسیاری از پنیرها نقش ایفا می کند. همچنین از آن به عنوان مولفه اصلی در محیط کشت آغازگر استفاده می شود [۵]. هر چند در ایران پنیرهای حاصل از شیر خام گوسفند، مشابه کشورهای اروپایی متنوع نیست اما از دیرباز پنیرهای معروفی چون پنیر لیقوان و کوزه در استان های آذربایجان شرقی و غربی و حتی کشورهای همسایه تولید می گردد و به شدت مورد توجه مصرف کنندگان قرار دارند. تولید این پنیرها بدون افزودن آغازگر تجاری و با تکنیک های پنیرسازی قدیمی و سنتی صورت می گیرد[٦]. حضور انتروکوکوس ها در پنیر لیقوان به اثبات رسیده است که منجر به ایجاد عطر و طعم مطلوب می شود اماعلی رغم داشتن تمامی این ویژگی ها انتروکوکوس ها به عنوان GRASشناخته نمی شوند و حضور آن ها در فراورده های غذایی نشانه ای از آلودگی مدفوعی می باشد [۷ و ۸].

۱-۱-شاخص های بیماری زایی

در گذشته شاخص های بیماری زایی در انتروکوکوس ها ناشناخته بود اما امروزه تا حد زیادی این شاخص ها شناسایی شده است.

فاکتور تجمعی (asa1) یک عامل پروتئینی سطحی القا شده توسط فرومون ها در انتروکوکوس ها می باشد که منجر به اتصال محکم باکتری هایی که قصد انتقال پلاسمید به یکدیگر را دارند، می شود[۹ و ۱۰].این عامل همچنین به عنوان یک سوپر آنتی ژن، اتصال باکتری را به سلول های یوکاریوتی مثل ماکروفاژهای انسانی، سلول های اپیتلیال روده و ماتریکس های پروتئین خارج سلولی مثل فیبرونکتین، ترومبوسپوندین وکلاژن نوع یک، تسهیل می کند [۱۱ و ۱۲]. ثابت شده است که چسبندگی به ماتریکس پروتئینهای خارج سلولی نقش مهمی در ایجاد عفونت در جراحات، زخمها و همچنین آندوکاردیت باکتریایی دارد [۱۳ و ١٤].

ژلاتیناز (gel E) یک متالواندوپپتیداز خارج سلولی است که در هیدرولیز ژلاتین، کلاژن، هوموگلوبین وپپتید های دیگر نقش دارد[۱۷]. تولید آنزیم ژلاتیناز در *انتروکوکوس فکالیس*های غذایی نیز متداول است [۱۵ و ١٦]. ایتون و گاسون همچنین ثابت کردند، حتی در مواردی که ژن ژلاتیناز در باکتری وجود دارد، امکان مشاهده فنوتیپ معکوس محتمل می باشد، بطوریکه هیچ یک از *انتروکوکوس فکالیس*ها در این تحقیقات تولید آنزیم ژلاتیناز نمیکردند[۱۵].

پروتئین سطحی سلول (esp) اولین بار توسط شانکر و همکاران ،در *انتروکوکوس فکالیس* های کلینیکی شناسایی شد. مطالعات بر روی شیوع این پروتئین سطحی نشان داد که اکثر *انتروکوکوس فکالیس* های ایجاد کننده عفونت دارای این عامل هستند. احتمالا esp در چسبندگی وسرکوب سیستم ایمنی میزبان نقش دارد [۱۸].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

فرمون های جنسی (cpd) محصول شکست پپتید های ۲۲-۲۱ اسید آمینه ای هستند که با لیپوپروتئین های سطحی در ارتباط می باشند[۹] . این عامل که در واقع یک نوع پروتئین سطحی به شکل یک آنتی ژن است، می تواند منجر به تغییرات پاتولوژیکی مانند التهاب حاد در میزبان شود. فرمون ها در انسان و موش صحرایی با تولید سوپراکسید و ترشح آنزیم های لیزوزومی خاصیت کماتوتوکسیک از خود بروز می دهند [۱۹].

عامل اتصال به کلاژن (ace) شباهت ساختاری زیادی به cna(پروتئین متصل شونده به کلاژن) در *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد. مشابه مکانیسمی که شانکر و همکاران برای esp پیشنهاد کرده بودند، این عامل می تواند منجر به سرکوب سیستم ایمنی شود. Ace نه تنها به کلاژن متصل می شود، بلکه به لامینین نیز اتصال می یابد. در واقع انتروکوکوس ها ace را در هنگام ایجاد عفونت در انسان ها بیان می کنند[۲۰].

۱-۲- ویژگی های تکنولوژیکی انتروکوکوس ها

فعالیت پروتئولیتیک توسط آنزیم های تولید شده از انتروکوکوس ها در هیدرولیز پروتئین های شیر نظیر کازئین، آلفالاکتاآلبومین، بتالاکتاگلوبولین و آلبومین مشاهده شده است. درواقع، توانایی تخریب پروتئین ها بستگی به نوع گونه و سویه دارد[۲۱]. انتروکوکوس ها ممکن است لیپازو یا استراز داشته باشند، اما حضور آنزیم ها به نوع سویه و سوبسترا بستگی دارد [۲۲].انتروکوکوس ها فعالیت استرولیتیک بالاتری از دیگر جنس های باکتری های اسید لاکتیک نشان می دهند. *انتروکوکوس فاسیوم* استرولیتیک ترین گونه در انتروکوکوس ها می باشد [۲۳ و ۱]. فعالیت استرازی با لیپولیز چربی شیر منجر به تولید متیل کتون ها و تیواسترها از اسید های چرب شده که باعث بهبود طعم محصول می شود . لیپولیز تأثیر مستقیمی بر رئولوژی پنیر ندارد، اما بعضی گلیسرید های تولید شده با داشتن فعالیت سطحی بر بافت پنیر تأثیر می گذارند [۱].

فعالیت اتولیتیکی به خاطر رها شدن آنزیم های درون سلولی نظیر پروتئازها و لیپازها که در رسیدگی پنیر و تولید عطر و طعم مؤثر می باشند ، اهمیت پیدا می کند. حضور سلول های دست نخورده برای انجام واکنش های فیزیولوژیکی نظیر تخمیر لاکتوز، حذف اکسیژن و واکنش های دیگری جهت ایجاد طعم ضروری می باشد ولی در مقابل، حضور سلول های اتولیز شده در پنیر به تسریع واکنش های پپتیدولیتیک کمک می کند [۲٤].

ایجاد اسیدیته بالا و کاهش سریع pHدر اوایل دوره رسیدگی فرآورده های تخمیری نظیر پنیر حائز اهمیت است و باعث جلوگیری از رشد باکتری های خارجی و کواگولاسیون سریع می شود. باکتری های اسید لاکتیک کربوهیدرات ها را تخمیر کرده و اسید لاکتیک تولید می کنند. اسید لاکتیک تولیدی باعث کاهش pHشده و باعث دلمه بستن شیر و خروج آب پنیر می شود. همچنین تولید اسید اثر مهمی روی تشکیل بافت، آروما و طعم دارد [۲۵].

اگزوپلی ساکارید تولید شده توسط باکتری های اسیدلاکتیک در ضمن فرآیند تخمیر، تأثیر زیادی بر بافت فرآورده های لبنی تخمیری دارد. این ترکیبات یا به شکل کپسول هایی به دیواره سلولی متصل شده اند و یا به محیط خارج سلولی تراوش می شوند [۲۸]. اگزوپلی ساکارید چند نقش مختلف، از قبیل حفاظت از باکتری ها در مقابل خشک شدن، فاگوسیتوز و حمله فاژها، تأمین فشار بیشتر اکسیژن، مشارکت در جذب یون های فلزی و ایفای نقش به عنوان عوامل چسبنده را به عهده دارند [۲۹]. ترکیبات اگزوپلی ساکارید به عنوان مواد طبیعی غلیظ کننده یا تثبیت کننده با حفظ آب باعث بهبود خواص رئولوژی فرآورده های لبنی تخمیری و کاهش آب اندازی می شوند. اگر چه مواد اگزوپلی ساکارید هیچ طعمی ندارند، ولی با افزایش ویسکوزیته فرآورده و تبعا افزایش مدت اقامت در دهان و مدت تماس با گیرنده های چشایی، به ادراک و دریافت طعم آن کمک می نمایند [۳۰].

خواص دوگانه انتروکوکوس ها به عنوان میکروارگانیسم مفید یا پاتوژن فرصت طلب، امروزه محققان را بر آن داشته تا به بررسی دقیق انتروکوکوس های ذاتی جدا شده از مواد غذایی بپردازند و تاثیر آن ها بر سلامت مصرف کننده و امکان استفاده به عنوان آغازگر را در فراورده های لبنی مورد بررسی قرار دهند. هدف از این پژوهش ارزیابی شاخص های بیماری زایی و خواص تکنولوژیکی جدایه های *انتروکوکوس فاسیوم* حاصل از پنیر های سنتی ایران، به منظور تایید بی خطر بودن برای مصرف کننده و در نهایت امکان به کارگیری از آنها به عنوان آغازگر و یا کمک آغازگر در فرآورده های لبنی به ویژه پنیرها می باشد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

۲- مواد و روش ها

۲-۱- سویه های باکتریایی مورد بررسی

در این پژوهش ۵۷ جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* حاصل از پنیر لیقوان و پنیر کوزه مورد ارزیابی قرار گرفتند[۷].

Table 1 Bacterial strains tested

Row	Bacteria code	Row	Bacteria code	Row	Bacteria code
1	M1	20	LF44	39	KR25
2	M9	21	LF50	40	KR26
3	M13	22	LF54	41	KR27
4	C15	23	LR59	42	KR30
5	C16	24	LR61	43	KR31
6	C17	25	LR66	44	KR32
7	C18	26	LR67	45	KR34
8	C19	27	LR68	46	KR35
9	C20	28	LR73	47	KR36
10	C21	29	LR74	48	KR37
11	C31	30	LR75	49	KR38
12	C32	31	LR76	50	KR39
13	C33	32	LR77	51	KR40
14	LF36	33	LR78	52	KR41
15	LF37	34	KR17	53	KR42
16	LF39	35	KR18	54	KR43
17	LF40	36	KR19	55	KR45
18	LF41	37	KR20	56	KR46
19	LF42	38	KR21	57	KR48

۲-۲-فعال سازی جدایه ها

جدایه های*انتروکوکوس فاسیوم* از فریزر منفی ۸۰ خارج شده و سپس در محیط کشت جامد اختصاصی انتروکوکوس (M17) به صورت خطی کشت داده می شود. گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام خواهد شد.

۲-۳-آزمون های تاییدی

۲-۳-۱- رنگ آمیزی گرم

ابتدا کلنی موردنظر برداشت شده و گستره خشک بر روی لام تهیه می گردد. گستره با سه بار عبور دادن از روی شعله بر روی لام ثابت می شود. سپس به مدت یک دقیقه با کریستال ویوله پوشانده می شود تا رنگ جذب سلول شود. پس از شستشو با آب، از محلول لوگل به مدت ۱ دقیقه برای شستشو استفاده می گردد. در ادامه از محلول الکل-استون به مدت ۱۳ ثانیه برای شستشوی لام استفاده کرده (نقش رنگبری برای کریستال ویوله) و در نهایت لام با آب شستشو داده می شود. به منظور تکمیل رنگ آمیزی، سطح گستره با رنگ سافرانین به مدت ٤٣ ثانیه پوشانده می شود. سپسس یک بار دیگر شستشو داده می شود و بعد از خشک شدن، به منظور مشاهده باکتری ها، لام در زیر میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمایی ۱۰۰ × قرار گرفته و گرم مثبت بودن و یا منفی بودن باکتری مشخص می شود [۳۱].

۲-۳-۲-آزمون کاتلاز

استفاده از یک قطره هیدروژن پراکسید بر روی هر یک از سویه های مورد نظر و تشکیل یا عدم تشکیل حباب های گاز، به ترتیب، مثبت یا منفی بودن نتیجه آزمون را مشخص می کند [۳۱].

۲-٤-بررسی وجود ژن های بیماری زایی با استفاده از تکنیک multiplex PCR

در این مرحله برای بررسی وجود ژن های بیماری زایی از تکنیک multiplex PCR استفاده شد که این هدف با استفاده

از سه واکنش مجزا محقق گردید. پرایمر های مورد استفاده در جدول ذیل ذکر شده است.

Table 2 Primers

primer	sequence
Forward Van A	5' - CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA -3'
Reverse Van A	5' - CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA -3'
Forward Van B	5' - GTGACAAACCGGAGGCGAGGA-3'
Reverse Van B	5' - CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA -3'
Forward esp	5’ - AGATTTCATCTTTGATTCTTGG-3’
Reverse esp	5’ - AATTGATTCTTTAGCATCTGG-3’
Forward gelE	5’ - TATGACAATGCTTTTTGGGAT-3’
Reverse gelE	5’ - AGATGCACCCGAAATAATATA-3’
Forward asa1	5’ - GCACGCTATTACGAACTATGA-3’
Reverse asa1	5’ - TAAGAAAGAACATCACCACGA-3’
Forward cpd	5’- TGGTGGGTTATTTTTCAATTC-3’
Reverse cpd	5’ - TACGGCTCTGGCTTACTA-3’
Forward ace	5’ - GGAATGACCGAGAACGATGGC-3’
Reverse ace	5’ - GCTTGATGTTGGCCTGCTTCCG-3’

۲-٤-۱-بررسی وجود ژن های Van A و van B در multiplex PCR اول از پرایمرهایی که هدف آن ها بررسی وجود ژن های Van A و Van B بود، استفاده شد.

واکنش PCR در کیت خشک PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفتکه شامل موارد زیر بود:

۱۰ میکرولیتر Red master mix، ۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه گرید بیولوژی مولکولی، ۳ میکرولیتر DNA و ۱ میکرولیتر از هر کدام یک از پرایمر های Forward and Reverse Van A، ۰,۵ میکرولیتر از هر کدام یک از پرایمرهای Forward and Reverse Van B.

پس از اضافه کردن هر یک از اجزای مخلوط واکنش، میکروتیوبها در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند و برنامه دمایی به صورت ذیل تنظیم گردید [۳۲].

فعال سازی: دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، یک سیکل.

واسرشته سازی: دمای ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، اتصال : (annealing) دمای۵۱ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، توسعه : (Extension) دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، ۳۰ سیکل.

توسعه نهایی: دمای ۷۲ درجه سانتی گرادبه مدت ۱۰ دقیقه، یک سیکل.

۲-٤-۲-بررسی وجود ژن های asa1، gel E وesp

در multiplex PCR دوم از پرایمرهایی که هدف آن ها به طور اختصاصی بررسی وجود ژن های gelE،asa1 و esp بود، استفاده شد.

واکنش PCR در کیت خشک PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت که شامل موارد زیر بود:

۱۰میکرولیتر Red master mix، ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه گرید بیولوژی مولکولی،۲/۵ میکرولیتر DNA، ۱ میکرولیتر از هر کدام یک از پرایمر های Forward and Reverse esp، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام یک از پرایمرهای Forward and Reverse gelE، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام یک از پرایمرهای Forward andReverse asa1.

پس از اضافه کردن هر یک از اجزای مخلوط واکنش، میکروتیوب ها در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند و برنامه دمایی به صورت ذیل تنظیم گردید [۳۳]:

فعال سازی: دمای۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، یک سیکل

واسرشته سازی: دمای۹٤ درجه سانتی گرادبه مدت یک دقیقه، اتصال (Annealing) : دمای ٤۹ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، توسعه (Extension): دمای۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، ۳۰ سیکل.

توسعه نهایی: دمای۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، یک

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

سیکل.

۲-٤-۳- بررسی وجود ژن هایcpdوace

درmultiplex PCRسوماز پرایمرهایی که هدف ان ها به طور اختصاصی بررسی وجود ژن هایcpd و ace بود، استفاده شد.

واکنش PCRدر کیت خشک PCRدر حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت که شامل موارد زیر بود:

۱۰ میکرولیتر Red master mix، ۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه گرید بیولوژی مولکولی، ۲ میکرولیتر DNA، ۱ میکرولیتر از هر کدام یک از پرایمر های Forward and Reverse cpdو ۱/۵ میکرولیتر از هر کدام یک از پرایمرهای Forward and Reverse ace.

پس از اضافه کردن هر یک از اجزای مخلوط واکنش، میکروتیوب ها در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند و برنامه دمایی به صورت ذیل تنظیم گردید [۳۳].

فعال سازی: دمای۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، یک سیکل.

واسرشته سازی: دمای ۹٤ درجه سانتی گرادبه مدت یک دقیقه، اتصال(Annealing):دمای۵۰ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، توسعه (Extension): دمای۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، ۳۰ سیکل.

توسعه نهایی: دمای۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، یک سیکل.

پس از انجام واکنش های PCR برای مشاهده نتایج، الکتروفورز انجام شد و باکتریهای دارای ژن های بیماری زا شناسایی شدند.

۲-۵- بررسی ویژگی های تکنولوژیکی

۲-۵-۱- فعالیت لیپولیتیک

فعالیت لیپولیتیکی جدایه ها بر اساس ایجاد هاله در محیط کشت تری بوتیرین آگار بررسی گردید. هاله روشن ایجاد شده در اطراف پرگنه ها نشان دهنده فعالیت لیپولیتیک می باشد. برای بررسی فعالیت لیپولیتیکی جدایه ها بر روی محیط کشت تری بوتیرین آگار کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷ روز گرمخانه گذاری گردیدند. شعاع هاله در اطراف کلونی ها برحسب میلی متر اندازه گیری شد که نشان دهنده شدت فعالیت لیپولیتیکی است [۳٤].

۲-۵-۲-فعالیت اتولیتیک

رسوب سلولی حاصل از سانتریفوژ کشت شبانه با OD600 = 0.8 – 1، با بافر پتاسیم فسفات تا OD600 = 0.6 –0.8رقیق سازی شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری شد [۳۵]. در نهایت میزان فعالیت اتولیتیکی به صورت کاهش درصد جذب در ٦۰۰ نانومتر بر اساس فرمول زیر اندازه گیری شد:

$$(A0-At)/A0\times100$$

A0= جذب اولیه

At= جذب ثانویه بعد از مدت زمان گرمخانه گذاری شده

بر اساس این فرمول انتروکوکوس ها از نظر اتولیز شدن به صورت زیر درجه بندی می شوند [۳٦] :

خوب = ٦٦ – ۳۳ ، نسبتا خوب = ۳٤ – ۲٤ و ضعیف = ۲۲ – ۰

۲-۵-۳- فعالیت پروتئولیتیک

سوسپانسیون انتروکوکوس در بافر پتاسیم فسفات تهیه گردید. از این سوسپانسیون به مقدار ۲ میکرولیتر بر روی سطح محیط کشت اسکیم میلک آگار (۲ درصد اگار و ۱۰ درصد شیر پس چرخ) نقطه گذاری شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ٤ روز گرمخانه گذاری گردید. تشکیل هاله روشن در اطراف کلونی ها، نشان دهنده فعالیت پروتئولیتیکی می باشد [۳۷].

۲-۵-٤-فعالیت اسیدیفیکاسیون

برای بررسی فعالیت اسیدیفیکاسیون ابتدا ۱ ٪ حجمی –حجمی از سویه فعال شده در محیط کشت M17 به لوله های حاوی ۱۰ میلی لیتر از شیر پس چرخ استریل (۱۰٪ وزنی –حجمی)، تلقیح گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شد. pH بلافاصله بعد از تلقیح (زمان صفر)، ۲٤ ساعت بعد از تلقیح مورد اندازه گیری قرار گرفت. سپس درجه اسیدیفیکاسیون با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۳٦].

$$\Delta pH = pH24 - pH0$$

۲-۵-۵- مقاومت حرارتی

جهت بررسی مقاومت حرارتی، سویه های تلقیح شده به محسط کشت M17 Broth در دماهای ٦۰، ٦۵، ۷۰، ۷۵، ۸۰ و ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ و ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفتند. سپس به مدت ۱٦ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند و جذب سویه ها در طول موج ٦۰۰ نانومتر خوانده شد [۳۸].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

۲-۵-۶- مقاومت به اسید

ابتدا pHمحیط کشت M17 Broth را با استفاده از اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال در pHهای ۳، ۳,۵، ٤، ٥ و ٦ تنظیم شده و سپس سویه ها به محیط کشت مذکور تلقیح گردید. سویه ها به مدت ١٦ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد و سپس جذب سویه ها در طول موج ٦٠٠ نانومتر خوانده شد [۳۸].

۲-۵-۷- تولید اگزوپلی ساکارید

سویه های فعال شده در محیط کشت M17آگار بر روی محیط کشت روتنیوم رد میلک آگار که حاوی عصاره مخمر (۵٪)، اسکیم میلک (۱۰٪)، ساکاروز (۱٪)، آگار (۱/۵٪) و روتنیوم رد (۰/۰۸٪) می باشد، به صورت خطی کشت داده شدند. با ایجاد کلونی های سفید رنگ توسط سویه ها، تولید اگزو پلی ساکارید ها تایید خواهد شد [۳۹].

۲-۵-۸- فعالیت ضد میکروبی

ابتدا جدایه های انتروکوکوس فاسیوم روی محیط کشت M17 Agar کشت خطی داده شد و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه صورت گرفت. سپس سویه ها به محیط کشت M17 Broth منتقل شد و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از ایجاد کدورت، به مقدار ۵ میکرولیتر بر روی محیط کشت BHI Agarنقطه گذاری گردید و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری شد [۷]. پس از رشد سویه ها، سطح محیط کشت توسط یک لایه اگار نرم (حدود ۱۰ سی سی) که به میزان ۰/۲۵ درصد با میکروارگانیسم های شاخص تلقیح شده بود، پوشانده شد. مجددا پلیت ها در دمای رشد میکروارگانیسم های شاخص به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری شدند. وجود هاله شفاف در اطراف نقاط تلقیح شده با انتروکوکوس فاسیوم نشان دهنده عدم رشد میکروارگانیسم شاخص و در نتیجه خاصیت ضد باکتریایی سویه ها بود [٤٠].

۲-٦-تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌ها در قالب طرح بلوک کاملا تصادفی و حداقل در سه تکرار با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه و دوطرفه و با کمک نرم‌افزار SPSS(آمریکا، نسخه ۲۳) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون دانکن انجام پذیرفت و تمامی تجزیه‌وتحلیل داده‌ها در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی حضور ژن های بیماری زایی

Multiplex PCR اول برای تشخیص همزمان ژن های van A و van Bانجام گرفت. از بین ۵۷جدایه مورد بررسی هیچ کدام حاوی ژن van B نبودند و تنها ٤ جدایه حاوی ژن van A بودند. در Multiplex PCRدوم که برای تشخیص همزمان ژن های gel E، esp وasa1 انجام گرفت، از بین ۵۷ جدایه مورد بررسی ٦ جدایه حاوی ژن espو ۱۹ جدایه حاوی ژن asa1 بودند و همه جدایه ها فاقد ژن gel E بودند. Multiplex PCR سوم برای تشخیص همزمان ژن های cpd و ace نیز انجام شد که از بین ۵۷ جدایه مورد بررسی ۲۰ جدایه حاوی ژن cpd و ۲۲ جدایه حاوی ژن ace بودند.

Table 3 Examining the presence of pathogenic genes

pathogenic genes							Bacteria code	Row
ace	Cpd	asa1	gel E	esp	Van B	Van A		
-	-	+	-	-	-	-	M1	1
-	-	+	-	-	-	-	M9	2
-	-	+	-	-	-	+	M13	3
-	-	-	-	-	-	+	C15	4
-	-	-	-	-	-	-	C16	5
-	-	+	-	-	-	-	C17	6
-	-	-	-	-	-	-	C18	7
-	-	+	-	-	-	-	C19	8
-	-	-	-	-	-	-	C20	9
-	-	-	-	-	-	-	C21	10
+	+	-	-	-	-	-	C31	11
+	+	+	-	-	-	-	C32	12

-	-	-	-	-	-	-	C33	13
+	+	+	-	-	-	-	LF36	14
-	-	+	-	-	-	-	LF37	15
+	+	+	-	-	-	-	LF39	16
-	-	-	-	-	-	+	LF40	17
-	-	-	-	-	-	+	LF41	18
-	-	+	-	-	-	-	LF42	19
+	+	-	-	+	-	-	LF44	20
+	+	+	-	-	-	-	LF50	21
-	-	-	-	-	-	-	LF54	22
-	-	-	-	-	-	-	LR59	23
-	-	+	-	-	-	-	LR61	24
+	+	+	-	-	-	-	LR66	25
+	+	+	-	-	-	-	LR67	26
+	+	-	-	-	-	-	LR68	27
+	+	+	-	-	-	-	LR73	28
+	-	+	-	-	-	-	LR74	29
+	-	+	-	-	-	-	LR75	30
+	+	+	-	-	-	-	LR76	31
+	+	+	-	-	-	-	LR77	32
-	-	-	-	-	-	-	LR78	33
+	+	-	-	+	-	-	KR17	34
-	-	-	-	-	-	-	KR18	35
-	-	-	-	-	-	-	KR19	36
+	+	-	-	-	-	-	KR20	37
-	-	-	-	-	-	-	KR21	38
-	-	-	-	-	-	-	KR25	39
-	-	-	-	-	-	-	KR26	40
+	+	-	-	+	-	-	KR27	41
+	+	-	-	-	-	-	KR30	42
-	-	-	-	-	-	-	KR31	43
-	-	-	-	-	-	-	KR32	44
-	-	-	-	-	-	-	KR34	45
+	+	-	-	+	-	-	KR35	46
-	-	-	-	-	-	-	KR36	47
-	-	-	-	-	-	-	KR37	48
-	-	-	-	-	-	-	KR38	49
-	-	-	-	-	-	-	KR39	50
+	+	-	-	-	-	-	KR40	51
+	+	-	-	-	-	-	KR41	52
-	-	-	-	-	-	-	KR42	53
+	+	-	-	+	-	-	KR43	54
-	-	-	-	+	-	-	KR45	55
-	-	-	-	-	-	-	KR46	56
-	-	-	-	-	-	-	KR48	57
22	20	19	0	6	0	4	Total	

در نهایت از بین ۵۷ سویه تنها ۲۳ سویه فاقد هرگونه ژن بیماری زایی بودند که این ۲۳ نمونه به مرحله بعد برای بررسی خواص تکنولوژیکی راه یافتند.

۳-۲-ارزیابی فعالیت اتولیتیک

فعالیت اتولیتیک، توانایی سویه ها در لیز کردن سلول و انتشار آنزیم های درون سلولی (نظیر لیپاز و پروتئاز) در طی رسیدن پنیر است که یکی از ویژگی های مهم باکتری های اسید لاکتیک محسوب می شود . در این راستا، فرانسیوسی و همکاران در مطالعه بر پتانسیل تکنولوژیکی و زیستی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از شیر گاو، نشان دادند که حداکثر سرعت و

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

میزان فعالیت اتولیتیکمتعلق به گونه *انتروکوکوس فکالیس* بود و گونه های *انتروکوکوس دورانس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* نیز فعالیت اتولیز مناسبی داشتند [۳۷]. آیاد و همکاران در مطالعه بر جدایه های باکتری های اسید لاکتیک ، گزارش کردند که فعالیت اتولیتیک سویه های باکتری های اسید لاکتیک متفاوت بوده و به سه گروه خوب، متوسط و ضعیف تقسیم بندی می شوند. لاکتوباسیلوس ها درجه اتولیز بالاتری نسبت به انتروکوکوس ها و سویه های لاکتوکوکوس نشان دادند [۳٦]. آسپری و همکاران نیز در ارزیابی فعالیت اتولیتیک انتروکوکوس ها مشاهده کردند که در بین ۵۷ سو یه انتروکوکوس مورد بررسی، تنها ۱۰ سویه از انتروکوکوس ها فعالیت اتولیتیک بالا داشتند. بنابراین با توجه به مطالعات فوق، فعالیت اتولیتیک جهت آزادسازی بعضی از آنزیم های درون سلولی، یک صفت مطلوب در تولید بعضی از فرآورده های لبنی نظیر پنیر شناخته می شود [٤١].

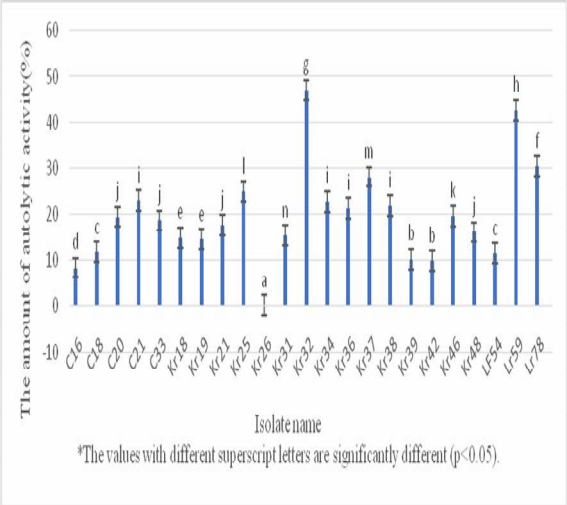

Fig 1 Investigation of autolytic activity

یکی از راه های سرعت بخشیدن تولید فرآورده های لبنی اضافه کردن کشت همراه می باشد که انتخاب سویه های کشت همراه باید بر اساس پروفایل آنزیم ها (نظیر آنزیم پروتئاز) و ویژگی های اتولیتیک صورت گیرد [٤٢]. همچنین نتایج مطالعه دعوتی و همکاران بر فعالیت اتولیتیکی گونه های انتروکوکوس نشان داد که انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس به ترتیب بالاترین درجه اتولیز شدن را داشتند [٤٣].

در این پژوهش جدایه های Lr59و kr32 دارای فعالیت اتولیتیکی خوب، جدایه های kr25و Lr78 دارای فعالیت اتولیتیکی نسبتا خوب و سایر جدایه ها دارای فعالیت اتولیتیکی ضعیف می باشند.

۳-۳-ارزیابی فعالیت اسیدیفیکاسیون

برای تولید نوشیدنی های لبنی تخمیری میزان تولید اسید یک فاکتور مهم می باشد که از متابولیسم لاکتوز شیر ناشی شده و در ایجاد عطر و طعم فرآورده های تخمیری نقش دارند. کاهش pH، مانع رشد باکتری های غیر مطلوب ازجمله باکتری های عامل فساد و بیماری زا می شود. یک باکتری مزوفیلیک مناسب با کاهش pHبه تولید اسید توسط کشت آغازگر در شیر سرعت می بخشد [٤٤]. در این پژوهش سویه LF54 و c21 بیشترین کاهش pH (۱/۹ واحد) و سویه Kr25 کمترین کاهش pH(۱/۳۵ واحد) را نشان دادند.

طبق طبقه بندی نیتو آریباس و همکاران، جدایه ها برحسب توانایی کاهش pH بعد از ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری، به سه گروه تقسیم بندی می شوند : ۱) آن هایی که ظرفیت اسیدی بالا با کاهش pH بیش از ۲ واحد دارند؛ ۲) آن هایی که ظرفیت اسیدی متوسط با قابلیت کاهش pH در محدوده ۱/۵-۲ واحد دارند و ۳) آن هایی که ظرفیت اسیدی پایین با توانایی کاهش pH کمتر از ۱/۵ واحد را دارند [٤٥].

بر اساس این طبقه بندی جدایه های Kr19، Kr25و Lr78ظرفیت اسیدی پایین و سایر جدایه ها ظرفیت اسیدی متوسطی دارند.

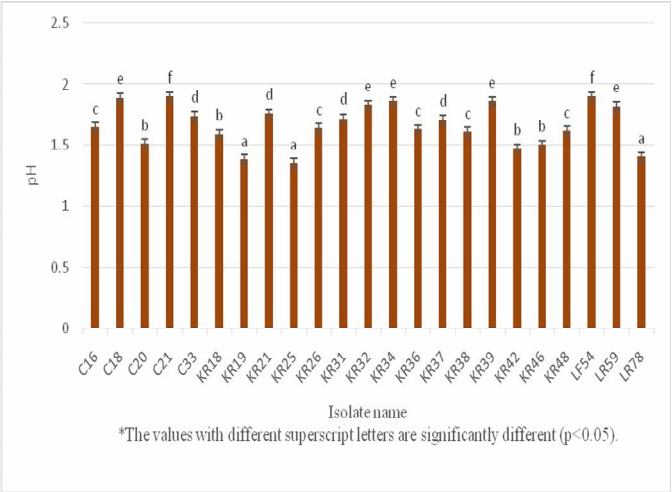

Fig 2 Acid production capability of the isolates

طبق مطالعه پژوهشگران، انتروکوکوس ها فعالیت اسیدی متوسط با کاهش pH در محدوده ۱/۵-۲واحد برخوردار هستند. سویه های *انتروکوکوس فکالیس* پایین ترین مقدار pH و بیشترین فعالیت اسیدی را داشته و به دنبال آن سویه های *انتروکوکوس فاسیوم* بوده اند [۲۳ و ٤٦]. مطالعه دعوتی و همکاران بر فعالیت اسیدیفیکاسیون جدایه های شیر شتر نشان داد، که بیشترین کاهش pH مربوط به *انتروکوکوس دورانس*، *انتروکوکوس مونداتی*، *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس دورانس* بوده است [٤٣].

۳-٤-ارزیابی فعالیت لیپولیتیک

کشت های همراه، با توجه به ویژگی های دیگری نظیر فعالیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی نیز انتخاب می شوند، که فعالیت لیپولیتیک به عنوان یک فرآیند مهم در توسعه عطر و طعم و بافت فرآورده های لبنی نظیر پنیر می باشد [٤]. این فرآیند توسط آنزیم لیپاز، تری گلیسریدها را هیدرولیز کرده و منجر به تولید ترکیبات مولد عطر و طعم مانند متیل کتون، استرها و لاکتون ها می شود و گزارش ها حاکی از آن است ، که انتروکوکوس فکالیس بیشترین فعالیت لیپولیتیک را داشته و به دنبال آن انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس دورانس بوده است [۲۳ و٤٧].تایج به دست آمده از مطالعه محققان درزمینه ارزیابی لیپولیتیک با استفاده از محیط تری بوترین آگار، نشان دهنده فعالیت پایین لیپولیتیک در انتروکوکوس ها بوده است [۳٤، ٤، ٤٨ و ٤١]. از طرفی در مطالعه ماسدو ومالکاتا، سویه ای از *انتروکوکوس فاسیوم* توانسته به میزان بیشتری چربی شیر را نسبت به *لاکتوکوکوسلاکتیس* هیدرولیز کند [٤٩]. مطالعه دعوتی و همکاران، در فعالیت انتروکوکوس های جدا شده از شیر شتر نشان داد، که جدایه ها از فعالیت لیپولیتیکی مناسبی برخوردار بوده و انتروکوکوس فکالیس بالاترین فعالیت لیپولیتیکی را نشان داده است [٤٣]. 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. از سوی دیگر، لیپولیز در شیرهای تخمیری نامطلوب است [٥٠].
در این پژوهش دو جدایه c16 و c33 فاقد فعالیت لیپولیتیکی بودند و به ترتیب بیشترین وکمترین فعالیت لیپولیتیکی مربوط به جدایه c21 و جدایه c20 بود.

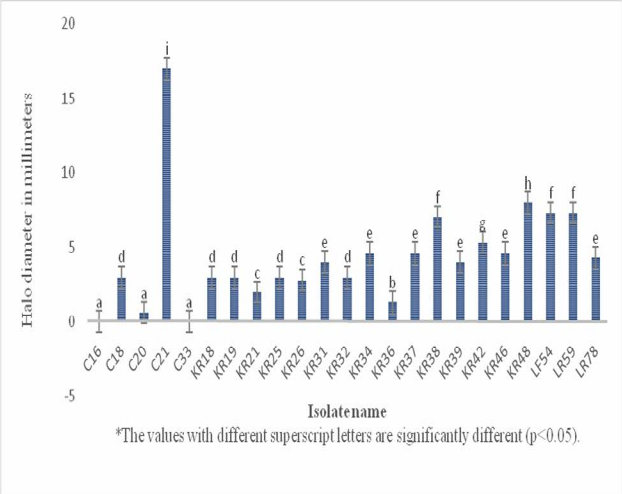

Fig 3 Assessment of lipolytic activity

۳-۵- ارزیابی فعالیت پروتئولیتیک

به گفته پژوهشگران تخریب کازئین در ارتباط با فعالیت پروتئولیتیک و پپتیدولیتیک میکروارگانیسم ها، یک نقش نشانگر در رسیدن پنیر و بافت پنیر ایفا می کند [۵۱،۲۷ و٤٧]. علاوه بر این، برخی از پپتید ها به تشکیل عطر و طعم مطلوب درمحصول کمک می کنند و برخی پپتید های دیگر منجر به عطر و طعم نامطلوب می شوند. علاوه بر آنزیم های پروتئولیتیک بومی شیر و آنزیم رنینی که در انعقاد پروتئین نقش دارند، پروتئاز و پپتیدازهای داخل سلولی پس از لیز شدن دیواره سلولی باکتری های اسید لاکتیک، در دلمه آزاد شده که نقش مهمی در هیدرولیز کازئین در طول آماده سازی پنیر ایفا می کنند [٥٢]. در این راستا، میزان فعالیت های پروتئازی و پپتیدازی در انتروکوکوس ها پایین بوده به طوری که فعال ترین آن ها انتروکوکوس فکالیس می باشد [۲۳]. طبق گفته پژوهشگران فعالیت پروتئولیتیک به نوع سویه و زمان وابسته است، بر این اساس سویه ای با فعالیت پروتئولیتیک، می تواند باگذشت زمان فعالیت بالاتری هم داشته باشد [٥٣].

فرانسیوسی و همکاران در بررسی ویژگی های تکنولوژیکی جدایه های اسید لاکتیک شیر گاو، فعالیت پایین پروتئولیتیکی باکتری های اسید لاکتیک را گزارش کردند به طوریکه فقط ۸ سویه (*لاکتوکوکوسلاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* *NS38*، استافیلوکوکوس اورئوس V96، V98وV99، انتروکوکوس فکالیس N4 و P343 و انتروکوکوس دورانس V25و V1) قادر به ایجاد هاله در محیط کشت شیر پس چرخ بودند [۳۷].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

آسپری و همکاران مشاهده کردند که ۷۸٪ سویه های انتروکوکوس مورد بررسی، قادر به ایجاد هاله در محیط کشت شیر پس چرخ بودند و ۲۲ ٪ از سویه ها به دلیل عدم تشکیل هاله در محیط، قادر به فعالیت پروتئولیتیکی نبودند [۴۱]. برر سی دعوتی و همکاران نشان داد، که انتروکوکوس های جدا شده از شیر شتر دارای فعالیت پروتئولیتیکی قابل مشاهده که قادر به ایجاد هاله در اطراف کلنی باشد، نبودند [۴۳].

در این پژوهش جدایه Kr32 هیچ فعالیت پروتئولیتیکی نداشت و جدایه c18بیشترین و جدایه Kr42 کمترین میزان فعالیت پروتئولیتیکی را داشتند.

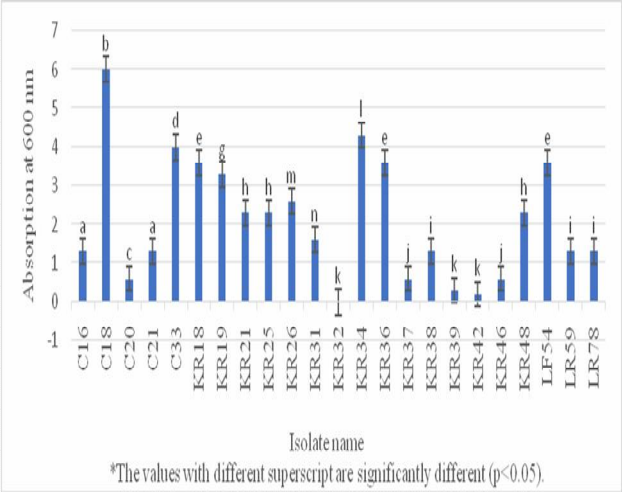

Fig 4 Evaluation of proteolytic activity

۳-۶-ارزیابی تولید اگزوپلی ساکارید

طبق مطالعه آسپری و همکاران ۳۶ ٪ از سویه های انتروکوکوس مورد بررسی توانایی تولید اگزوپلی ساکارید داشتند و آن را به عنوان یک مزیت معرفی کردند، زیرا منجر به احساس دهانی بهتر (مانند ویسکوزیته بهتر، بافت نرم و حالت خامه ای) می شود. به عنوان مثال، سویه های تولید کننده اگزوپلی ساکارید به عنوان کشت آغازگر در تولید پنیرهای اساکاندیناوی به منظور ایجاد بافت بهتر (بافت طنابی) استفاده شده است. علاوه بر این، باکتری های تولید کننده اگزوپلی ساکارید را می توان جایگزین هیدروکلوئیدها کرد ، تا در تولید فرآورده های تخمیری به کاهش هزینه ها کمک نمود. به غیر از نقش آن ها در بهبود رئولوژی فرآورد ههای لبنی تخمیری، باکتری های اسید لاکتیک تولید کننده اگزوپلی ساکارید احتمال یک نقش محافظتی در برابر عوامل محیطی مثل خشک شدن، فاگوسیتوز، حمله فاژها، استرس اسمزی، آنتی بیوتیک و یا ترکیبات سمی بازی می کند [۵۴]. همچنین تولید اگزوپلی ساکارید یک صفت مطلوب برای باکتری های پروبیوتیک برای کلونیزه شدن آن ها در دستگاه گوارش است [۴۱].

از بین ۲۳ سویه مورد بررسی، ۱۶ جدایه قادر به تولید کلنی سفید رنگ بر روی محیط کشت روتنیوم رد میلک (RRM) بودند بنابراین توانایی تولید اگزوپلی ساکارید را دارند.

Table 4 Examination of exopolysaccharide production

Exopolysaccharide production	Bacteria code	Exopolysaccharide production	Bacteria code
+	KR34	-	C16
+	KR36	-	C18
+	KR37	+	C20
+	KR38	+	C21
+	KR39	-	C33
+	KR42	-	KR18
+	KR46	-	KR19
+	KR48	+	KR21
-	LF54	-	KR25
+	LR59	+	KR26
+	LR78	+	KR31
16	Total	+	KR32

۳-۷- ارزیابی مقاومت به اسید

ریحام و همکاران در ارزیابی مقاومت سویه های *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از یک فرآورده لبنی تخمیری تونسی به شرایط اسیدی در pHهای ۱ تا ۵ گزارش کردند، بقای سویه های *انتروکوکوس فاسیوم* در pHهای ۳، ٤ و ۵ بیشتر بوده است و در مقابل بقای سویه ها در شرایط اسیدی بالاتر pHهای ۱ و ۲ با افزایش زمان و گرمخانه گذاری ، کاهش پیدا کرده است [۵۵]. همچنین احمدووا در مطالعه خود روی *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از پنیر، گزارش کرد که سویه مورد مطالعه در محیط کشت Broth MRSبا مقادیر pHپایین ۷ تا ۱۱ به خوبی رشد کرده، در pH = 13 رشد آهسته تر بوده و در pHهای ۳ و ٤ رشد مشاهده نشده است [۵٦]. مقاومت به شرایط اسیدی (pHپایین) به عنوان یکی از شاخصه های مهم باکتری های اسید لاکتیک در نظر گرفته می شود ، زیرا توانایی آن ها در بقاء و همچنین رشد در روده کوچک را نشان می دهد

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

[۵۷ و ۵۸]. مقاومت سویه های *انتروکوکوس فاسیوم* مورد بررسی در pHهای ۳، ۳/۵، ٤، ٥ و ٦ نشان داد که رشد سویه ها با کاهش pH محیط کشت ، کاهش پیدا کرده است. در pHهای ٥ و ٦، رشد به خوبی صورت گرفته اما با کاهش pH روند رشد نزولی و بسیار کند شده است. همچنین بیشترین میزان مقاومت به اسید رو جدایه Lr78 دارد و بعد از آن Kr36 و Lr59 مقاومت به شرایط اسیدی را نشان دادند.

Table 5 Examination of acid resistance at different pH

PH=3	PH=3.5	PH=4	PH=5	PH=6	Bacteria code	Row
0.086 e	0.168 c	0.310 b	0.404 a	1.309 a	C16	1
0.076 d	0.094 b	0.201 a	0.456 a	1.139 a	C18	2
0.085 e	0.093 b	0.202 a	0.506 b	1.189 b	C20	3
0.053 c	0.060 a	0.136 c	0.499 a	1.393 a	C21	4
0.077 d	0.111 e	0.154 c	0.524 b	1.483 c	C33	5
0.051 c	0.070 b	0.079 d	0.515 b	1.263 a	Kr18	6
0.093 b	0.140 d	0.237 a	0.574 b	1.159 b	Kr19	7
0.080 e	0.097 b	0.284 a	0.406 a	1.352 a	Kr21	8
0.050 c	0.063 b	0.175 b	0.583 b	1.293 a	Kr25	9
0.077 d	0.182 c	0.185 a	0.510 b	1.083 d	Kr26	10
0.106 a	0.114 e	0.207 a	0.455 c	1.247 a	Kr31	11
0.105 a	0.113 e	0.304 b	0.416 a	1.273 a	Kr32	12
0.093 b	0.095 b	0.267 b	0.440 c	1.221 a	Kr34	13
0.145 f	0.182 c	0.297 b	0.680 d	1.321 c	Kr36	14
0.097 b	0.112 e	0.268 a	0.690 d	1.324 a	Kr37	15
0.102 a	0.113 e	0.239 a	0.404 a	1.211 a	Kr38	16
0.118 f	0.184 c	0.206 a	0.505 e	1.199 b	Kr39	17
0.089 e	0.114 e	0.229 c	0.369 f	1.174 b	Kr42	18
0.057 c	0.091 b	0.212 d	0.384 f	1.219 c	Kr46	19
0.067 b	0.160 c	0.259 b	0.507 e	1.160 b	Kr48	20
0.085 d	0.153 f	0.310 e	0.484 e	1.189 b	LF54	21
0.126 f	0.137 g	0.292 a	0.657 g	1.249 e	Lr59	22
0.158 g	0.168 c	0.197 b	0.640 g	1.265 a	Lr78	23

*The values with different superscript letters in a same column are significantly different ($p<0.05$)

۳-۸- ارزیابی مقاومت حرارتی

حضور انتروکوکوس ها در شیر پاستوریزه به دلیل مقاومت آن ها در دمای ٦٢/٨ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه می باشد. گسترش و تداوم انتروکوکوس ها در طول رسیدن فرآورده های لبنی به گستره دمایی رشد (٤٥ – ١٠)، مقاومت به حرارت، مقاومت به pH در محدوده ٩/٦ – ٤ و زنده مانی در کلرور سدیم ٦/٥٪ نسبت داده شده است [٤٧]. انتروکوکوسها ممکن است، به طور طبیعی در کشت آغازگر فرآورده های لبنی وجود داشته باشند. کشت آغازگر معمولا از باکتری های اسید لاکتیک گرمادوست تشکیل شده است که وجود انتروکوکوس ها به طور طبیعی در کشت آغازگر به دلیل مقاومت حرارتی بالا و ماهیت گرمادوستی آن می باشد . در واقع، کشت آغازگر توسط یک فرآیند سنتی با پاستوریزه کردن شیر خام باکیفیت مناسب و گرمخانه گذاری در دمای ٤٤-٤٢ درجه سانتی گراد به مدت ١٥-١٢ ساعت ایجاد می شود؛ بنابراین انتخاب طبیعی باکتری های اسید لاکتیک به *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*و انتروکوکوس های گرمادوست و مقاوم به حرارت محدود می شود [٥٩].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

بررسی کیرنز و همکاران در ارزیابی مقاومت حرارتی سویه های *انتروکوکوس فا سیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* در دماهای ٦٥، ٧١، ٧٥، و ٨٠ درجه سانتی گراد به مدت ٣٠ دقیقه گزارش کردند که تمام سویه های *انتروکوکوس فاسیوم* در دمای ٦٠ درجه سانتی گراد به مدت ٢٠ دقیقه و برخی سویه ها در دماهای ٧١، ٧٥ و ٨٠ درجه سانتی گراد برای سه دقیقه بقا داشت. این در حالی است که تمام جدایه های *انتروکوکوس فکالیس* نیز در دمای ٦٥ درجه سانتی گراد به مدت ١٠ دقیقه و دمای ٧١ درجه سانتی گراد به مدت ٣ دقیقه بقا داشتند [٢٤].

Table 6 Evaluation of thermal resistance

T=85 (30min)	T=85 (15min)	T=80 (30min)	T=80 (15min)	T=75 (30min)	T=75 (15min)	T=70 (30min)	T=70 (15min)	T=65 (30min)	T=65 (15min)	T=60 (30min)	T=60 (15min)	bacteria code
0.207a	0.228 a	0.577 c	0.971 a	1.496 a	1.560 b	1.589 b	1.701 b	1.736 a	1.762 a	1.963 a	2.249 a	C16
0.153d	0.222 a	0.227 c	0.242 a	0.264 b	0.485 a	1.546 b	1.694 b	1.762 a	1.845 a	1.987 a	2.149 b	C18
0.225a	0.236 a	0.247 b	0.307 b	1.580 a	1.689 c	1.764 c	1.895 c	1.987 b	2.082 b	2.498 e	2.635 e	C20
0.240 a	0.282 b	0.300 a	0.336 a	0.399 b	1.639 c	1.791 c	1.859 c	1.929 b	2.096 b	2.221 c	2.648 e	C21
0.156d	0.28 a	0.289 a	0.302 a	0.349 b	1.653 b	1.722 c	1.853 c	1.898 a	2.033 b	2.358 d	2.650 e	C33
0.175e	0.242 c	0.249 b	0.257 a	1.653 b	1.684 c	1.759 c	1.793 b	1.973 b	1.981 a	2.257 c	2.402 d	Kr18
0.228a	0.254 c	0.278 c	0.282 b	0.366 a	0.378 a	1.852 d	1.896 c	1.922 b	2.091 b	2.172 b	2.217 a	Kr19
0.133d	0.158 d	0.215 a	0.246 a	0.269 a	0.285 b	1.490 b	1.820 c	1.937 b	2.221 d	2.499 e	2.608 e	Kr21
0.107f	0.142 d	0.222 a	1.298 c	1.584 a	1.691 c	1.789 d	1.841 c	2.100 d	2.242 d	2.288 c	2.525 d	Kr25
0.142d	0.154 d	0.184 d	0.210 a	0.224 b	0.286 a	0.320 a	1.799 b	1.806 a	2.193 c	2.242 c	2.281 a	Kr26
0.163e	0.186 a	0.235 b	0.260 a	0.284 b	1.545 b	1.825 d	1.981 d	2.032 c	2.102 c	2.271 c	2.302 c	Kr31
0.162e	0.252 a	0.267 b	0.281 b	0.286 b	1.756 b	1.845 e	1.891 c	1.796 b	2.200 d	2.226 c	2.282 a	Kr32
0.206a	0.255 a	0.298 a	0.313 b	0.319 c	0.500 a	1.806 c	1.899 c	2.037 c	2.158 c	2.266 c	2.314 c	Kr34
0.234b	0.253 b	0.261 d	0.271 a	0.278 c	0.304 b	1.789 c	1.848 c	1.879 a	2.041 b	2.398 c	2.540 d	Kr36
0.241b	0.251 b	0.261 d	0.267 a	0.279 a	0.284 c	0.300 a	1.859 c	1.984 b	2.023 b	2.222 c	2.285 a	Kr37
0.241b	0.264 c	0.284 a	0.297 a	0.322 d	1.697 c	1.818 d	1.858 c	1.965 b	2.997 e	2.117 b	2.282 a	Kr38
0.232b	0.267 c	0.299 b	0.322 b	1.794 d	1.869 d	1.887 e	2.013 e	2.037 c	2.126 c	2.195 b	2.293 a	Kr39
0.244b	0.254 b	0.261 c	0.266 a	0.272 a	0.283 a	0.293 a	1.871 c	1.946 b	1.986 a	2.037 a	2.224 a	Kr42
0.273c	0.284 a	0.313 b	1.521 d	1.644 b	1.807 d	1.928 e	1.961 d	1.995 b	2.063 b	2.093 a	2.149 a	Kr46
0.199g	0.23 b	0.570 c	1.106 d	1.190 b	1.400 b	1.781 c	1.862 c	1.892 a	1.926 a	2.209 c	2.272 a	Kr48
0.250 c	1.234 e	1.522 e	1.666 e	1.744 d	1.895 d	1.835 c	1.855 c	1.933 b	1.956 a	1.994 a	2.098 b	LF54
0.151d	0.181 d	0.245 c	0.251 a	0.273 a	0.286 a	1.260 b	1.422 a	1.893 a	1.930 a	1.946 a	2.114 b	Lr59
1.688h	1.755 e	1.779 e	1.834 f	1.866 e	1.955 e	1.999 f	2.043 e	2.054 c	2.229 d	2.366 d	2.414 d	Lr78

*The values with different superscript letters in a same column are significantly different ($p<0.05$)

برادلی و فرایسی در مطالعه بر مقاومت حرارتی انتروکوکوس های حساس و مقاوم به ونکومایسین گزارش کردند که تنها یک نوع سویه بالینی بالاترین مقاومت را نشان داده به طوری که در دمای ٦٥ درجه سانتی گراد به مدت ١٠ دقیقه، دمای ٧١ درجه سانتی گراد به مدت ٣ دقیقه و دمای ٨٠ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه بقا داشت. در صورتی که تمام سویه های بالینی به غیر از سویه های حساس به ونکومایسین، مقاومت متفاوتی نشان دادند. سه تا از سویه ها در دمای ٨٠ درجه سانتی گراد برای بیشتر از سه دقیقه بقا داشتند که این سویه ها مقاوم به ونکومایسین بودند [٦٠]. با توجه به تحقیقات صورت گرفته انتروکوکوس ها مقاومت حرارتی مناسبی دا شته به طوری که در پاستوریزاسیون شیر زنده می مانند و می توان به عنوان کشت همراه از انتروکوکوس ها جهت تخمیر فرآورده لبنی استفاده کرد.

٣-٩- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی

حضور انتروکوکوس های تولید کننده باکتریوسین در فرآورده های تخمیری، اثر بازدارندگی بر باکتری های عامل فساد و بیماری زا دارد، همینطور انتروکوکوس ها مخصوصا *انتروکوکوس*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

فاسیوم و *انتروکوکوس دورانس* از جهت فعالیت های لیپولیتیک، پروتئولیتیک و تجزیه سیترات نقش بسزایی در ایجاد عطر و طعم فرآورده های تخمیری ایجاد میکنند ، اما انتروکوکوس ها منجر به بیماری هایی چوناندوکاردیت، باکترمیا و عفونت های ادراری می شوند. مقاومت آن ها به آنتی بیوتیک های متعدد ازجمله ونکومایسین و همینطور وجود فاکتورهای تهاجمی باعث شده تا در صورت استفاده از انتروکوکوس ها در فرآورده های تخمیری، اثرات منفی آن ها در سلامت مصرف کننده مورد بررسی قرار گیرد [٦١ و٦٢].

Table 7 Evaluation of antimicrobial activity

Indicator microorganisms					Bacteria code	Row
Listeria	*Escherichia coli*	*Staphylococcus aureus*	*Lactococcus lactis*	*Lactobacillus plantarium*		
-	-	-	-	-	C16	1
-	+	+	-	-	C18	2
-	-	+	-	-	C20	3
-	+	-	-	-	C21	4
-	-	+	+	-	C33	5
+	-	+	+	+	KR18	6
+	+	-	+	+	KR19	7
-	-	+	+	-	KR21	8
-	+	+	-	+	KR25	9
+	-	+	+	+	KR26	10
-	-	-	+	+	KR31	11
-	+	-	-	+	KR32	12
+	+	-	-	+	KR34	13
-	-	-	-	-	KR36	14
+	+	-	-	+	KR37	15
-	-	-	-	-	KR38	16
-	+	+	+	-	KR39	17
+	-	-	-	+	KR42	18
+	+	-	-	+	KR46	19
-	+	+	-	+	KR48	20
-	+	+	-	+	LF54	21
-	+	-	+	-	LR59	22
-	-	-	-	-	LR78	23
7	12	10	8	12	Total	

بل جاسم و همکاران گزارش کردند که در ارزیابی فعالیت ضد میکروبی سویه های*انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از گوشت تخمیر شده تونسی، سویه هایی از انتروکوکوس فاسیوم در برابر چندین باکتری عامل فساد و بیماری زا از جمله *لیستریا*، *انتروکوکوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* فعالیت ضد میکروبی نشان داده و همچنین یکی از سویه ها در برابر *اشرشیاکلی* فعال بوده است [٦٣].

نتایج بررسی سویه های انتروکوکوس جدا شده از کفیر توسط کارگزاری و همکاران نشان داد که سویه های *انتروکوکوس دورانس* قادر به مهار پاتوژن های گرم مثبت و گرم منفیبودند [٦٤]. موراندی و همکاران در بررسی ویژگی های ژنوتیپی، فنوتیپی و تکنولوژیکی جدایه های باکتری های اسید لاکتیک، گزارش کردند که فقط سویه های *انتروکوکوسفاسیوم* قادر به مهار *لیستریا مونوسیتوژنز* بوده و هاله ای به قطر ١٤ میلی متر ایجاد کردند و پنج جدایه (یک سویه از *استرپتوکوکوس* ، ٣ سویه از *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و یک سویه از *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*) فعالیت آنتاگونیستی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* (١١-٨ میلی متر) نشان دادند [٤]. در این پژوهش تنها ٤ جدایه هیچ گونه فعالیت ضد میکروبی نداشتند و سایر جدایه ها داری فعالیت ضد میکروبی در برابر باکتری های *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم*، *لاکتوکوکوس لاکتیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *لیستریا* بودند.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

٤- نتیجه گیری

در این پژوهش ۵۷ جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* حاصل از پنیر های سنتی ایران ابتدا از لحاظ حضور ژن های بیماری زایی شامل ژن مقاومت به ونکومایسین (van A و van B)، ژلاتیناز (gel E)، پروتئین سطحی انتروکوکوس (esp)، فاکتور تجمعی (asa1)، فرمون های جنسی (cpd) و عامل اتصال به کلاژن (ace) با استفاده از روش multiplex PCR غربالگری شدند. ۲۳ جدایه فاقد هر گونه ژن بیماری زایی بودند که خواص تکنولوژیکی آن ها بررسی شد. تمام سویه های مورد مطالعه در این پژوهش بجز ٤ سویه LR78، KR38، KR36 و C16 دارای فعالیت ضد میکروبی در برابر باکتری های بیماری زای شاخص *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم*، *لاکتوکوکوسلاکتیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی*، *لیستریا* بودند. از بین ۲۳ سویه، ۱٦ سویه قادر به تولید اگزوپلی ساکارید بودند. دو سویه LR59 و KR32 دارای فعالیت اتولیتیک خوب بودند. بیشترین فعالیت پروتئولیتیک و لیپولیتیک به ترتیب مربوط به سویه های C18 و C21 می باشد. بغیر از سه سویه KR19، KR25 و LR78 که ظرفیت اسیدی پایینی دارند، سایر جدایه ها فعالیت اسیدیفیکاسیون متوسطی دارند. همچنین جدایه های مورد بررسی دارای مقاومت حرارتی و مقاومت به اسید مناسبی بودند. مخصوصا سویه LR78 بیشترین مقاومت به اسید و بیشترین مقاومت حرارتی را از خود نشان داد. بنابراین بطور کلی می توان گفت این جدایه ها از خصوصیات تکنولوژیکی مطلوبی برخوردار هستند.

۵- منابع

[1] Giraffa, G. (2003a). Functionality of enterococci in dairy products. International Journal of Food Microbiology, 88(2), 215-222.

[2] Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H., & Stiles, M. E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? A Review. International Journal of Food Microbiology, 47, 1–24.

[3] Alvarez-Cisneros.Y.M, Fern_andez. F.J, Sainz-Espunez.T and Ponce-Alquicira.E. 2016. Assessment of virulence factors, antibiotic resistance and amino-decarboxylase activity in Enterococcus faecium MXVK29 isolated from Mexican chorizo. Letters in Applied Microbiology 64, 171-176.

[4] 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.

[5] Girraffa, G. 2002. Enterococci from foods. FEMS Microbiology reviews, 26:163-171.

[6] Wouters J.T.M., Ayad E.H.E., Hugenholtz J., and Smit G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. International Dairy Journal, 12: 91-109.

[7] Edalatian, M.R, 2011. Identifying and determining the identity of the lactic flora of cheeses obtained from raw milk using methods based on culture medium and molecular methods. PhD thesis. Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

[8]Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Dupre, I., Sechi, L.A., 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between Enterococcus faecium strains of dairy, animal and clinical origin. International Journal of Food Microbiology 88: 291–304.

[9] Clewell, D.B. 1990. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9: 90–102.

[10] Dunny, G.M.; Leonard, B.A.; Hedberg, P.J. 1995. Pheromone-inducible conjugation in Enterococcus faecalis: interbacterial and host-parasite chemical communication. J. Bacteriol. 177: 871–876.

[11] Kreft, B.; Marre, R.; Schramm, U.; Wirth, R. 1992. Aggregation substance of Enterococcus faecalis mediates adhesion to cultured renal tubular cells. Infect. Immun. 60: 25–30.

[12] Sartingen, S.; Rozdzinski, E.; Muscholl-Silberhorn, A.; Marre, R. 2000. Aggregation substance increases adherance and internalization, but not translocation, of Enterococcus faecalis through different intestinal epithelial cells in vitro. Infect. Immun. 68: 6044–6047.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

[13] Benn, M.; Hagelskjaer, L.H.; Tvede, M. 1997. Infective endocarditis, 1984 through 1993: a clinical and microbiological survey. J. Int. Med. 242: 15–22.

[14] Rozdzinski, E.; Marre, R.; Susa, M.; Wirth, R.; Muscholl-Silberhorn, A. 2001. Aggregation substance- mediated adherence of Enterococcus faecalis to immobilized extracellular matrix proteins. Microb. Path. 30: 211–220.

[15] Eaton, T.J., Gasson, M.J., 2001. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Applied and Environmental Microbiology 67: 1628–1635.

[16] Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancannet, M., Swings, J., Holzapfel, H.W., 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4385– 4389.

[17] Sulzer, G.; Busse, M. 1991. Growth inhibition of Listeria spp. on Camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. Int. J. Food Microbiol. 14: 287–296.

[18] Shankar, V., Baghdayan, A., Huycke, M.M., Lindahl, G., Gilmore, M.S., 1999. Infectionderived Enterococcus faecalis strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. Infect. Immun. 67: 193– 200.

[19] Johnson, A.P. 1994. The pathogenicity of enterococci. J. Antimicrob. Chemother. 33: 1083– 1089.

[20] Nallapareddy, S.R., Qin, X., Weinstock, G.M., Hook, M., Murray, B.E., 2000. Enterococcus faecalis adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I.Infection and Immunity 68: 5218– 5224.

[21] de Fernando, G. G. (2015). Lactic Acid Bacteria: Enterococcus in Milk and Dairy Products.

[22] de Fernando, G. G. (2015). Lactic Acid Bacteria: Enterococcus in Milk and Dairy Products.

[23] Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M.,...Tsakalidou, E. (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. International Dairy Journal, 11(8), 621-647.

[24] Kearns, A., Freeman, R., & Lightfoot, N. (1995). Nosocomial enterococci: resistance to heat and sodium hypochlorite. Journal of Hospital Infection, 30(3), 193-199.

[25] Ross, R. P., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G. F., & Coffey, A. (2000). Novel cultures for cheese improvement. Trends in Food Science & Technology, 11(3), 96-104.

[26] Morea, M., Baruzzi, F., &Cocconcelli, P. (1999). Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. Journal of Applied Microbiology, 87(4), 574-582.

[27] Durlu‐Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., &Litopoulou‐Tzanetaki, E. (2001). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. Journal of Applied Microbiology, 91(5), 861- 870.

[28] Guzel-Seydim, Z. B., Sezgin, E., &Seydim, A. C. (2005). Influences of exopolysaccharide producing cultures on the quality of plain set type yogurt. Food Control, 16(3), 205- 209.

[29] Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters, 87(1-2), 113-130.

[30] Duboc, P., &Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. International Dairy Journal, 11(9), 759-768.

[31] Mortazavi, A. Zirjani, L. TabatabaiYazdi, F. Applied and laboratory food microbiology. 1488. First edition. Publications of Ferdowsi University of Mashhad.

[32] Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. 2000. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol, 38: 3092-5.

[33] Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, et al. 2004. Development of a multiplex PCR for the detection of asa1, gelE, cylA, esp, and hyl genes in enterococci and survey for virulence determinants among European

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

International Dairy Journal, 16(7), 797-804.

[43] Dawati, N., Tabatabaei, F., Sebet, S., Shahahidi, F. and Adalatian, M.M. 2013. Isolation and identification of enterococci in the raw milk of Iranian one-humped camels and investigation of its technological properties. Journal of Veterinary Microbiology. 11th period, 2nd issue, 2014, serial 31:91-79.

[44] Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., Fernanedes, I.,... Ledda, A. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. Journal of Dairy Research, 64(3.421-419).

[45] Nieto‐Arribas, P., Seseña, S ..Poveda, J., Palop, L., & Cabezas, L. (2009). Genotypic and technological characterization of Lactococcus lactis isolates involved in processing of artisanal Manchego cheese. Journal of Applied Microbiology, 107(5), 1505- 1517.

[46] Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J. M., Chicón, R., Cabezas, L., &Palop, L. (2011). Enterococcus populations in artisanal Manchego cheese: biodiversity, technological and safety aspects. Food Microbiology, 28(5), 891-899.

[47] Giraffa, G. (2003b). Functionality of enterococci in dairy products. International Journal of Food Microbiology, 88(2-3), 215-222.

[48] Serio, A., Chaves-López, C., Paparella, A., &Suzzi, G. (2010). Evaluation of metabolic activities of enterococci isolated from Pecorino Abruzzese cheese. International Dairy Journal, 20(7), 459-464.

[49] Macedo, A. C., &Malcata, F. X. (1997). Role of adventitious microflora in proteolysis and lipolysis of Serra cheese: preliminary screening. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 205(1), 25-30.

[50] Herrero, M., Mayo, B., Gonzalez, B., & Suarez, J. (1996). Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. Journal of Applied Microbiology, 81(5), 565-570.

[51] Arizcun, C., Barcina, Y., & Torre, P. (1997). Identification and characterization of proteolytic activity of Enterococcus spp. hospital isolates of Enterococcus faecium. J Clin Microbiol 42: 4473-9.

[34] Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. International Journal of Food Microbiology, 106(1), 1-24.

[35] Mora, D., Musacchio, F., Fortina, M., Senini, L., &Manachini, P. (2003). Autolytic activity and pediocin‐induced lysis in Pediococcusacidilactici and Pediococcuspentosaceusstrains .Journal of Applied Microbiology, 94(4), 561-570.

[36] Ayad, E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H., & El-Soda, M. (2004). Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. Food Microbiology, 21(6), 715-725.

[37] Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., &Poznanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. International Dairy Journal, 19(1), 3-11.

[38] Papamanoli, E., Tzanetakis, N ..Litopoulou-Tzanetaki, E., &Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat science, 65(2), 859-867.

[39]Mora, D., Fortina, M., Parini, C., Ricci, G., Gatti, M., Giraffa, G., &Manachini, P. (2002). Genetic diversity and technological properties of Streptococcus thermophilus strains isolated from dairy products. Journal of Applied Microbiology, 93(2), 278- 287.

[40] Alegría, Á., Delgado, S., Roces, C., López, B., & Mayo, B. (2010). Bacteriocins produced by wild Lactococcus lactis strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. International Journal of Food Microbiology, 143(1), 61-66.

[41] Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill, C., &Papademas, P. (2016). Raw donkey milk as a source of Enterococcus diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. Food Control, 73, 81-90.

[42] Kenny, O., FitzGerald, R., O'Cuinn, G., Beresford, T., & Jordan, K. (2006). Autolysis of selected Lactobacillus helveticus adjunct strains during Cheddar cheese ripening.

R.,...Dellaglio, F. (2004). Assessment of novel probiotic Lactobacillus casei strains for the production of functional dairy foods. International Dairy Journal, 14(8), 723- 736.

[59] Giraffa, G., Carminati, D & ..Neviani, E. (1997). Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. Journal of Food Protection, 60(6), 732-738.

[60] Bradley, C., &Fraise .A. (1996). Heat and chemical resistance of Enterococci. Journal of Hospital Infection, 34(3), 191-196.

[61] Giraffa, G. (1995). Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-Listeria factors in dairy technology. Food Microbiology, 12, 291-299.

[62] TUNCER, B. Ö., Ay, Z., & Tuncer, Y. (2013). 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, 37(4), 443- 449.

[63] Belgacem, Z .B., Abriouel, H., Omar, N. B., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A., &Manai, M. (2010). Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic Enterococcus faecium from artisanal Tunisian fermented meat .Food Control, 21(4), 462-470.

[64] Kargozari, M., Moini, S., Basti, A. A., Emam-Djomeh, Z., Gandomi, H., Martin, I. R.,...Carbonell-Barrachina, Á. A. (2014). Effect of autochthonous starter cultures isolated from Siahmazgi cheese on physicochemical, microbiological and volatile compound profiles and sensorial attributes of sucuk, a Turkish dry-fermented sausage. Meat science, 97(1), 104-114.

isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. International Journal of Food Microbiology, 38(1), 17-24.

[52] Wilkinson, M .G., Guinee, T. P., O'Callaghan, D. M., & Fox, P. F. (1994). Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. Journal of Dairy Research, 61(02), 249-262.

[53] de Mendoza, M. S. C., Meinardi, C., & Simonetta, A. C. (1989). ActividadCaseinolíticaEndocelular de Enterococospara StartersLácticos. Revista Argentina de Lactología, 1(1), 45-54.

[54] Patel, A., &Prajapat, J. (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Advances in Dairy Research, 1-8.

[55] Rehaiem, A., Belgacem, Z. B., Edalatian, M. R ..Martínez, B., Rodríguez, A., Manai, M., & Guerra, N. P. (2014). Assessment of potential probiotic properties and multiple bacteriocin encoding-genes of the technological performing strain Enterococcus faecium MMRA. Food Control, 37, 343-350.

[56] Ahmadova, A., Todorov, S. D., Choiset, Y., Rabesona, H., Zadi, T. M., Kuliyev, A.,...Haertlé, T. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain Enterococcus faecium AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. Food Control, 30(2), 631-641.

[57] Walker, D. K., & Gilliland, S. E. (1993). Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus1. Journal of Dairy Science, 76(4), 956-961.

[58] Minelli, E. B., Benini, A., Marzotto, M., Sbarbati, A., Ruzzenente, O., Ferrario,

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-10]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69]

Evaluation of pathogenicity indicators and technological properties of *Enterococcus faecium* isolates obtained from traditional Iranian cheeses

Farkhondeh, T. [1], Yavarmanesh, M. [2*], Tabatabaei Yazdi, F. [3], Edalatian Dovom, M. R. [4]

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.
2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.
3. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.
4. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

ABSTRACT

Recently, special attention has been paid to enterococci for use as probiotics in dairy products. All these desirable features are a stimulus for the producers of dairy products to use enterococci isolated from dairy products such as Liqvan cheese. Despite having all these features, enterococci are not recognized as GRAS and their presence in food products is a sign of fecal contamination. The purpose of this research is to investigate enterococci isolated from Liqvan and Koze cheese in terms of having pathogenic indicators in order to confirm that they are safe for consumers and finally to investigate the possibility of using them as starters or starter aids in dairy products. Especially cheeses. Based on this, 57 isolates of Enterococcus faecium from traditional Iranian cheeses were examined for the presence of pathogenic genes, and finally 23 isolates did not have any pathogenic genes. Then the technological properties of these isolates such as acidification, proteolytic, lipolytic, autolytic, heat and acid resistance and exopolysaccharide production were investigated. The results showed that among the 23 investigated strains, 19 isolates had antimicrobial activity against pathogenic bacteria, 16 strains were able to produce exopolysaccharide and 20 isolates had moderate acidification properties. The highest proteolytic and lipolytic activity was related to strains c18 and c16, respectively, and strain LR78 showed the highest acid and heat resistance.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2023/ 01/ 18
Accepted 2023/ 02/ 26

Keywords:

Traditional cheese,
Enterococcus faecium,
Pathogenicity,
Technological properties.

DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69
DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.7.3

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