



## انتروکوکسی های جداسازی شده از فرآورده های شیری: مروری بر خطرات و استفاده تکنولوژیکی آن

محمد جواد شکوری<sup>۱</sup>، علیرضا شهاب لواسانی\*<sup>۲</sup>، عطیه حبیبی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۵

### چکیده

انتروکوکسی ها به عنوان پرتکرارترین سویه باکتریایی در فرآورده های لبنی و سایر محصولات غذایی موجود می باشد. اگرچه آن ها تعدادی از ویژگی های تکنولوژیکی مانند تولید باکتریوسین، ویژگی های پروبیوتیکی و سودمندی در تکنولوژی لبنیات را دارا می باشند اما هیچ موافقت عمومی در ارتباط با خطرات بیماری زایی و تهدید سلامت به عنوان پاتوژن های غذایی توسط آن ها وجود ندارد. پتانسیل پاتوژنیک باکتری های اسید لاکتیک شامل انتروکوکسی ها در عفونت های کلینیکی انسانی و ارتباط آن ها با اندوکارдит اخیراً تبدیل به یک موضوع چالش برانگیز شده است. این مطالعه اطلاعات موجود در ارتباط با اکولوژی میکروبی، ویژگی های بیوشیمیایی، تولید باکتریوسین های ضد لیستریا مونوسیژنوز و پتانسیل پاتوژنیک انتروکوکسی های جداسازی شده از فرآورده های مختلف شیری را بیان می کند.

**واژه های کلیدی:** فرآورده های لبنی، تکنولوژی لبنیات، انتروکوکسی، پتانسیل پاتوژنیک، پروبیوتیک، استارتر کالچر

\* shahabam20@yahoo.com

انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس<sup>۵</sup> تخمیر می شوند (۳).

### ویژگی های بیوشیمیایی انتروکوکوسی ها

تولید اسید و آنزیم از سویه های انتروکوکوس گزارش شده است و پیشنهاد شده است که وجود انتروکوکوسی ها در استارتر لاکتیکی پنیر چدار باعث بهبود عطر و طعم می شود (۶،۵). همچنین باور بر این است که فعالیت متابولیکی حاصل از انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس باعث بهبود عطر و طعم در پنیر ایتالیایی نیمه سخت (۱۳،۷)، پنیر یونانی (۱۴) و اسپانیایی (۱۵) می شود. و همچنین نشان داده شده است که انتروکوکوس ها باعث رسیدن پنیر روکیوفورت<sup>۶</sup> و پنیر پروولون<sup>۷</sup> می شود پیشنهاد می شود که تلقیح انتروکوکوس به عنوان قسمتی از استارتر کالچر لاکتیکی برای پنیر موزارالا<sup>۸</sup>، پنیر فونتینا<sup>۹</sup> و سایر پنیرها استفاده شود (۲۱، ۲۰، ۱۹، ۱۸، ۱۷، ۱۶، ۱۵).

۳۴ سویه از انتروکوکوس در پنیر ایتالیایی جداسازی و از لحاظ ویژگی های بیوشیمیایی طبقه بندی شده است (۲۲). پرتکرارترین سویه انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس بوده اما تعدادی از سویه ها ویژگی های بیوشیمیایی غیر معمول نشان دادند. فعالیت پروتئولیتیکی تولید اسید و زمان افزایش تعداد آن ها در حین رشد در شیر گاهی اوقات با استرپتوکوکوس ترموفیلوس<sup>۱۰</sup> قابل مقایسه بوده بنابراین مقاومت بالای انتروکوکوس خیلی هم تعجب آور نیست (۲۲). سویه انتروکوکوس فاسیوم به عنوان استارتر کالچر کمکی در تولید پنیر تالگو<sup>۱۱</sup> تاثیری بر روی پارامترهای تکنولوژیکی مثل سرعت اسیدیفیکاسیون و مقدار آب پنیر ندارد همچنین ویژگی های ارگانولپتیک و میکروبیولوژی پنیر تولیدی با انتروکوکوس فاسیوم با پنیر شاهد تفاوت چندانی ندارد (۲۳، ۲۴) برای جداسازی باکتری های انتروکوکوس از محیط کشت اختصاصی کانامایسین

### طبقه بندی ویژگی های عمومی و شناخته میکروبی انتروکوکوسی ها

جنس انتروکوکوس تحت بررسی اصلاحی طبقه بندی قرار گرفته است که به گروه بندی دقیق تر منجر شده است و تعداد گونه های مشخص مختص این جنس را افزایش داده است (۱،۲). از آنجایی که معرفی جنس های انتروکوکوس بر اساس دنباله ۱۶ s rRNA می باشد، حداقل ۱۸ گونه به زیر گروه تقسیم بندی شده است (۴،۳). برای مثال گونه انتروکوکوس فاسیوم<sup>۱</sup> شامل گونه های انتروکوکوس دورانس<sup>۲</sup> و انتروکوکوس هیرانه<sup>۳</sup> بوده و پتانسیل بیماری زایی دارند و سایر انتروکوکوس فاسیوم معمولاً به عنوان فلور رایج انسان و حیوانات در نظر گرفته می شود (۴). به عبارت دیگر دوارسیته<sup>۴</sup> و همکاران به این نکته اشاره کردند که بهره گیری از تست های معمولی به منظور تعیین انتروکوک ها مشکل بوده به ویژه آنهایی که با بیماری زایی انسان با توجه به شناخت اخیر گونه های جدید در ارتباط می باشند و اعتقاد بر این است که جنس انتروکوکوس به صورت فیلوژنتیکی یکپارچه و یکنواخت نبوده و سویه های انتروکوک می تواند به راحتی جدا سازی شده اما طبقه بندی آن ها دشوار می باشد (۳). انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس دورانس به طور گسترده در گیاهان، حشرات و حیوانات وحشی یافت می شود و ساکن دستگاه گوارش انسان و حیوانات می باشد. بسیاری از سویه ها در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد و ۴۵-۵۰ درجه سانتیگراد رشد کرده و در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه زنده مانده دارد. در ۶/۵٪ نمک و ۹/۶ = pH رشد می کند. علاوه بر این بسیاری از قندها توسط

<sup>7</sup> Provolone cheese

<sup>8</sup> Mozzarella cheese

<sup>9</sup> Fontina cheese

<sup>10</sup> *Streptococcus thermophilus*

<sup>11</sup> Taleggio cheese

<sup>1</sup> *Enterococcus faecium*

<sup>2</sup> *Enterococcus durans*

<sup>3</sup> *Enterococcus hirae*

<sup>4</sup> Devriese

<sup>5</sup> *Enterococcus faecalis*

<sup>6</sup> Roquefort cheese

ترموفیلس و زیر گونه های انتروکوکوس تعلق دارد (۲۸،۱۰،۱۸).

### پنیرهای تهیه شده از شیر پاستوریزه با استفاده از استارتر کالچر لاکتیکی انتخابی

در این محصولات که معمولاً پنیرهای تازه و نرم هستند حضور انتروکوکسی های نامطلوب باعث فساد به علت شرایط بهداشتی نامناسب در حین تولید می شود (۲۷). در دهه اخیر تغییر در سیستم تغذیه دام ها جمع آوری شیر و فرآیند کردن باعث بهبود کیفیت میکروبیولوژی صنایع لبنی شده است. انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس در پنیرهای ایتالیایی و اروپایی یافت می شود (۷،۱۰،۱۲،۱۵،۲۹،۳۰،۳۱). در تحقیقی صورت گرفته از ۴۸ نمونه پنیر که شامل انواع مختلفی از پنیر تازه ایتالیایی نرم و پنیر نیمه سخت رسیده بوده انتروکوکسی ها در بیش از ۹۶ درصد پنیرها یافت می شوند (۲۷). این تعداد بستگی به شرایط تولید و دوره رسیدن از  $10^5$  تا  $10^6$  cfu/g متفاوت است. در پنیرهای سخت و نیمه سخت تعداد سویه های انتروکوکوس بیشتر بوده و این ارگانسیم ها زنده مانده بیشتری نسبت به سایر میکروفلورها دارد (۲۷).

### عملکرد انتروکوکسی ها در فرآورده های لبنی

انتروکوکسی ها با سایر باکتری های اسید لاکتیک ترموفیل موجود در شیر خام به عنوان استارتر کالچر طبیعی عمل کرده و با سوبستراهای مختلف سازگار بوده و قادر به زنده مانده در دمای شیر یخچالی و همچنین دمای کم حرارت دهی پاستوریزاسیون می باشد (۳۲). عموماً کالچر طبیعی انتروکوک می تواند به وسیله پاستوریزاسیون شیر خام و انکوباسیون در دمای ۴۲ الی ۴۴ درجه سانتیگراد برای ۱۲ الی ۱۵ ساعت نگه داشته شود. بنابراین باعث ارتقای باکتری های اسید لاکتیک مقاوم به حرارت و ترموفیل می شود (مانند استرپتوکوکوس ترموفیلوس و زیرگونه های انتروکوکوس) باکتری های انتروکوکوس اغلب به عنوان میکروفلور ضروری از آب پنیر جداسازی شده که نتیجه حضور آن ها در شیر خام می باشد. انتروکوکسی ها به عنوان استارتر کالچر آب پنیر و طبیعی شیر

اسکولین آزید آگار<sup>۱</sup> به عنوان مناسب ترین محیط کشت برای شناسایی استفاده می شود (۲۵).

### حضور در فرآورده های لبنی

حضور انتروکوکسی ها در صنایع شیری مدت زمان زیادی است که به عنوان شاخص ناکارآمد بودن شرایط سالم سازی در حین تولید و فرآیند شیر به کار می رود. بسیاری از محققان پیشنهاد می کنند انتروکوکسی ها پتانسیل ایجاد نقش مطلوب در پنیر را به علت تعدد آن ها (بالای  $10^7$  تا  $10^8$ ) به عنوان میکروفلور طبیعی در بسیاری از پنیرها دارند (۲۱،۲۶،۲۷). در اثر پاستوریزاسیون شیر انتروکوک های موجود در شیر خام پنیرسازی بعید است زنده بماند با این حال رشد این باکتری ها در محیط پنیر بسیار مطلوب است در نتیجه اگر آلودگی ثانویه پس از پاستوریزاسیون رخ دهد در پایان دوره رسیدن احتمالاً شاهد میزان قابل توجهی از انتروکوک ها خواهیم بود به ویژه اگر دوره رسیدن طولانی باشد. بنابراین اگر از حضور انتروکوک های آلوده کننده اجتناب شود و در صورتی که انتروکوک ها در کالچر پنیر نیز اضافه نشده باشد در طول فرآیند تولید پنیر حفظ بهداشت و سلامت آن بایستی رعایت شود (۲۶،۲۷).

### پنیرهای تهیه شده از شیر خام: استفاده یا عدم استفاده از استارتر کالچر پنیری

این پنیرها معمولاً جزو پنیرهای سنتی نرم یا نیمه سخت هستند و اگر انتروکوکسی ها در شیر خام یا استارتر کالچر لاکتیکی طبیعی وجود داشته باشد باعث ارتقاء تولید و تکنولوژی و همچنین دوره رسیدن شده و نشان دهنده حضور میکروفلور غالب در پنیر است (۱۰،۷). جداسازی انتروکوکسی ها از استارتر کالچر طبیعی شیر می تواند توصیف کننده مقاومت دمایی باشد در حقیقت کالچر طبیعی شیر از طریق پاستوریزاسیون شیر خام با کیفیت خوب و انکوباسیون در ۴۲ تا ۴۴ درجه سانتیگراد برای ۱۲ الی ۱۵ ساعت به دست می آید. بنابراین بهبود انتخاب باکتری های لاکتیک اسید مقاوم به حرارت و ترموفیلیک معمولاً به استرپتوکوکوس

<sup>۱</sup> Kanamycin aesculin azide agar (Merck)

این دما برای ۱۵ الی ۳۰ دقیقه ادامه داشته باشد حساسیت به نمک‌ها و همچنین pH افزایش یافته و در دما ۷۶ درجه سانتی‌گراد انتروکوکوس‌ها به سدیم‌آزید حساس می‌شوند (۳۵). در سال ۱۹۸۲ پرز<sup>۲</sup> و همکاران مشاهده کردند که در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۹۰٪ انتروکوکوس دورانس، انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس در مدت ۱۳/۴، ۶/۳ و ۴/۵ دقیقه به ترتیب غیر فعال می‌شود در شیر کامل و در pH = ۶/۶ اگر دما به ۷۲ درجه سانتی‌گراد افزایش یابد ۹۰٪ سویه‌ها در ۹/۷، ۲/۴ و ۰/۸۸ ثانیه غیر فعال می‌شوند (۳۴).

### مقاومت به pH

انتروکوکوس‌ها به طور معمول در محدوده pH ۹/۶-۴ می‌تواند بسته به نوع گونه فعالیت کند (۳۵). در سال ۱۹۹۶ فرانز<sup>۳</sup> و همکاران بر روی رشد و فعالیت باکتریوسین‌های فاسیوم در محیط کشت MRS<sup>۴</sup> مطالعه کرده و بیان کردند بیشینه رشد (۸/۹-۸/۲۶ cfu/g) و فعالیت تولید باکتریوسین در محدوده قلیایی ملایم یا طبیعی pH ۶ الی ۹ می‌باشد (۳۳). در pH = ۱۰ سویه هنوز قادر به رشد در بالاترین سطح (cfu/g) در ۹/۲۸ بوده اما تولید باکتریوسین به ۵۰٪ کاهش می‌یابد در pH ۴ و ۵ کاهش رشد سویه اتفاق می‌افتد (۸-۱/۴ cfu/g) اما ۹۰٪ باکتریوسین‌های تولیدی فعال هستند در pH = ۳ سویه قادر به رشد نبوده و باکتریوسین‌های تولیدی فعال نخواهد بود (۳۳). پرز و همکاران بیان کردند انتروکوکوس دورانس و انتروکوکوس فاسیوم بیشینه مقاومت را در pH = ۶ داشته در حالی که انتروکوکوس فکالیس بیشینه زنده‌مانی را در pH = ۶/۶ در دماهای مختلف اعمالی دارد (۳۴).

### فعالیت پروتئولیتیک و پپتیدولیتیک

تجزیه کازئین در ارتباط با فعالیت پروتئولیتیک و پپتیدولیتیک میکروارگانیزم‌ها بوده در فرایند رسیدگی پنیر و بافت آن بسیار حائز اهمیت است (۳۲). تعدادی از پپتیدها باعث ایجاد عطر و بو و گاهاً پپتیدهای ایجاد کننده طعم تلخ باعث ایجاد بد طعمی می‌شوند (۳۸).

در شمال شرقی و جنوب شرقی کشورهای اروپایی از شیر خام و پاستوریزه تولید می‌شود. چندین گونه متفاوت از انتروکوکوسی‌ها در شیر خام و در نتیجه در شیر و فرآورده‌های لبنی موجود بوده که انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس رایج‌ترین و مهم‌ترین سویه در صنایع لبنی هستند. انتروکوکوس فاسیوم فراوانترین سویه در صنایع لبنی بوده و انتروکوکوس دورانس و انتروکوکوس کاسلیفلووس<sup>۱</sup> مهم‌ترین آن‌ها می‌باشد. کاربردهای مختلف انتروکوکوس‌ها در صنایع شیری مانند استارتر افزودنی پروبیوتیک‌ها کالچر حفاظتی می‌باشد (۳۲).

### مقاومت نسبت به حرارت

انتروکوکوسی‌ها می‌تواند در محدوده وسیعی از دما رشد نماید. گزارش شده است که انتروکوکوسی‌ها می‌تواند در دمای بین ۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد رشد نمایند. با این حال بهترین رشد در دمای بین ۱۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد اتفاق می‌افتد (۳۲، ۳۳، ۳۴). این میکروارگانیزم‌ها به عنوان باکتری‌های بدون اسپور مقاوم به حرارت شناخته می‌شوند (۳۴) در محیط‌های طبیعی می‌تواند در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه زنده بماند (۳۵). با این حال بسیاری از عوامل مانند ترکیب زمان - دما، تعداد انتروکوکوسی‌ها، سن سویه و pH، ترکیب مواد غذایی و اثر محافظتی محیط‌های پیرامون آن بر روی مقاومت حرارتی تاثیر گذار است (۳۵). در حقیقت اغلب انتروکوکوسی‌ها در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد رشد پیدا می‌کنند (۳۶). بیشینه مقاومت حرارتی آنها بالای ۴۵ درجه سانتی‌گراد است (۳۲) و محدوده pH بین ۶-۸ (۳۷) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ دقیقه باعث افزایش حساسیت انتروکوکوسی‌ها به نمک، نشاء اجزای سلولی و افزایش فاز تاخیری رشد می‌شود (۳۵). حرارت دهی در ۵۵ درجه سانتی‌گراد باعث آسیب به اجزای سلولی و از بین رفتن ترکیبات غشایی انتروکوکوسی‌ها می‌شود (۳۵). در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه فاز تاخیری رشد نیز افزایش می‌یابد و به پتاسیم حساس می‌شود (پتاسیم کلرید، منیزیم کلرید، تلوریت). اگر

<sup>3</sup> Franz

<sup>4</sup> De Man-Rogosa-Sharpe agar

<sup>1</sup> *Enterococcus casseliflavus*

<sup>2</sup> Pérez

انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس جداسازی شده از فرآورده های شیری تولید کننده عمده استالدهید، اتانول و استوئین هستند. به طور کلی در بین سه سویه انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس دورانس، انتروکوکوس فکالیس و بعد از آن انتروکوکوس فاسیوم تولید کننده غلظت بالای ترکیبات فرار هستند (۳۸).

### تولید باکتریوسین

باکتریوسین های انتروکوکی که انتروسین نامیده می شوند آنزیم های تولیدی توسط تعدادی از سویه های انتروکوکی هستند که اغلب توسط گونه های انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس که در مواد غذایی مانند فرآورده های لبنی، سوسیس ها، ماهی و سبزیجات حضور دارند، تولید می شود. به ویژه باکتریوسین های تولیدی توسط انتروکوکوس فاسیوم بسیار حائز اهمیت بوده و حدود ۱۵ سال پس از شناسایی اولین انتروسین یافت شدند (۴۴، ۴۵، ۴۶، ۴۷). انتروسین ها، کوچک، سنتز شده از ریبوزوم و رها شده از مواد برون سلولی، پپتیدهای آنتی باکتریال یا پروتئین هایی هستند که طیف ممانعت کنندگی محدود در برابر باکتری های گرم مثبت، پاتوژن های عامل مسمومیت و باکتری های عامل فساد دارد (۴۸). انتروسین ها معمولاً به باکتریوسین های طبقه ۲ متعلق است آن ها کوچک، غیر آنتی بیوتیکی و مقاوم به حرارت بوده که در شیر حضور داشته و قادر به تولید در گستره دمایی ۳۰ الی ۳۷ درجه سانتی گراد می باشد. غیر حساس به رنت و پایدار در محدوده وسیعی از pH و سازگار با سایر استارترهای سویه باکتری های اسید لاکتیک هستند (۳۲). به طور معمول ممانعت کنندگی قوی انتروکوک در برابر پاتوژن های عامل مسمومیت به ویژه لیستریا مونوسیژنوز<sup>۵</sup> به باکتریوسین های طبقه دوم باکتری های اسید لاکتیک تعلق دارند (۴۹). آن ها نقش نگهدارنده های طبیعی ایفا کرده و به عنوان کمک کالچر که در غذاهای تخمیری در رقابت بین سویه های تولیدی و

فعالیت های پروتئولیتیک اغلب مربوط به سویه های انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس دورانس بوده که از انواع مختلفی از پنیر جدا سازی شده اند (۳۹-۴۱). درجه پایین تر فعالیت در سویه انتروکوکوس دورانس مشاهده می شود و کمترین فعالیت مربوط به انتروکوکوس فاسیوم می باشد. طبق مشاهدات دورلو<sup>۱</sup> و همکاران یک همبستگی بین فعالیت پروتئولیتیکی و اسیدیفیکاسیون انتروکوکوسی ها وجود دارد. هرچه درجه اسیدیفیکاسیون بیشتر باشد فعالیت پروتئولیتیکی هم بیشتر است (۳۸).

### فعالیت لیپولیتیکی و استرازاها

طبق مشاهدات گیرفا<sup>۲</sup> استرازاها جزء آنزیم های هیدرولیز کننده سوبسترا در محلول های حاوی لیپاز می باشد (۳۲). استرازاها در ایجاد طعم و بافت در حین لیپولیز چربی شیر و تبدیل اسیدهای چرب آزاد به متیل کتون ها و تیواستر نقش دارند (۳۲). حتی اگر لیپولیز مستقیماً در رئولوژی پنیر نقش نداشته باشند اجزای گلیسیریدها جزء ترکیباتی هستند که با تاثیر بر روی مولکول های ارگانیک ها باعث ایجاد تاثیرات غیرمستقیم در بافت پنیر می شوند (۳۲). ویلانی<sup>۳</sup> در سال ۱۹۹۴ مشاهده کردند که فعالیت لیپولیتیکی انتروکوکوسی ها در شیر کامل بسیار پایین است و فعالیت استرولیتیک انتروکوکوسی ها بسیار پیچیده بوده اما نسبت به فعالیت لیپولیتیکی کارآمدتر است (۴۲). فعالیت استرولیتیکی انتروکوکوسی ها بیشتر از باکتری های اسید لاکتیک است (۳۲). طبق مشاهدات سارانتینپولوس<sup>۴</sup> فعالیت استرولیتیکی انتروکوکوس فاسیوم بیشتر از انتروکوکوس دورانس و انتروکوکوس فکالیس می باشد (۳۸).

### تولید ترکیبات فرار

در اثر شکستن لاکتوز و سیترات در حین رسیدن پنیر ترکیبات فرار مانند استالدهید، اتانول، دی استیل، استون و استوئین که مسئول عطر و طعم فرآورده های شیری تخمیری هستند ایجاد می شود (۳۸، ۴۳). بسیاری از سویه های

<sup>4</sup> Sarantinopoulos

<sup>5</sup> *Listeria monocytogenes*

<sup>1</sup> Durlu

<sup>2</sup> Giraffa

<sup>3</sup> Villani

هستند. *انتروکوکوس فاسیوم* CCM 4231 و *انتروکوکوس فاسیوم* RZS C13 به عنوان استارتر کالچر مورد استفاده قرار گرفته و با تولید باکتریوسین در برابر زیرگونه‌های لیستریا به شدت فعال هستند و در برابر باکتری‌های اسید لاکتیک غیر فعال می‌باشد (۵۲) سویه *انتروکوکوس فاسیوم* RZSC5 از پنیتر طبیعی جداسازی شده و در برابر لیستریا مونوسی‌توزنر فعالیت قوی دارد (۴۸). جدول ۱ خلاصه ای از باکتریوسین‌های شناخته شده توسط *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* را نشان می‌دهد.

جدول ۱- ویژگی‌های باکتریوسین‌های تولیدی *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* (۴۸)

ارگانسیم تولیدی	باکتریوسین
<i>انتروکوکوس فاسیوم</i>	انترو سین A
<i>انتروکوکوس فاسیوم</i>	انترو سین B
<i>انتروکوکوس فاسیوم</i>	انترو سین P
<i>انتروکوکوس فاسیوم</i>	انترو سین L50A
<i>انتروکوکوس فاسیوم</i>	انترو سین L50B
<i>انتروکوکوس فکالیس</i>	باکتریوسین 31
<i>انتروکوکوس فکالیس</i>	AS-48

سوسیس‌های تخمیری ممکن است بیشتر از ( $10^6$  cfu/g) *انتروکوکوس* داشته باشند بنابراین حتی اگر شاخص‌های بهداشتی و شرایط تولید مناسب باشد هیچ سطح قابل قبولی از *انتروکوکوس*‌ها نمی‌تواند برای مواد غذایی در نظر گرفته شود چرا که تعداد آنها به نوع محصول، حمل و نقل، مدت زمان انبارش و سایر عوامل وابسته است (۵۳).

#### پتانسیل پاتوژنیک *انتروکوکوس*‌ها

اگرچه زیرگونه‌های *انتروکوکوس* و سایر گونه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک عموماً بیماری‌زا هستند تحقیقات اخیر نشان داده است که *انتروکوکوس فکالیس* و سایر گونه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک عفونت‌های کلینیکی به‌ویژه اندوکاردیت ایجاد می‌نمایند (۵۴). بر اساس نتایج این تحقیقات پتانسیل بیماری‌زایی *انتروکوکوس*‌ها موضوع بحث چالش برانگیزی بوده زیرا مانند باکتری‌های اسید لاکتیک

نگهدارنده فساد غذایی و آلودگی مشارکت می‌کنند (نقش محافظتی) (۴۸). باکتریوسین‌های تولیدی توسط *انتروکوکوس*‌ها با فراهم آوردن پتانسیل تکنولوژیکی نقش محافظتی در برابر عوامل فساد مواد غذایی و پاتوژن‌های عامل مسمومیت مانند لیستریا مونوسی‌توزنر، زیرگونه‌های کلاستریدیوم مانند کلاستریدیوم بوتولینوم<sup>۱</sup>، کلاستریدیوم پرفرانترنر<sup>۲</sup>، استافیلوکوکوس اورئوس<sup>۳</sup>، زیرگونه‌های باسیلوس<sup>۴</sup>، زیرگونه‌های برکوتریکس<sup>۱</sup>، ویبریو کلرانه<sup>۲</sup> و باکتری‌های اسید لاکتیک عامل فساد دارند (۴۹،۵۰). با این حال *انترو سین*‌ها معمولاً در برابر لیستریا و کلاستریدیوم فعال

#### استانداردهای بین‌المللی غذا با تمرکز بر *انتروکوکوس*‌ها

به‌طور معمول منبع *انتروکوکوس*‌ها در غذا آلودگی مدفوعی می‌باشد با این حال توانایی *انتروکوکوس*‌ها در مسیر فرایند مواد غذایی و سایر محیط‌ها و همچنین مشاهده *انتروکوکوس*‌ها می‌تواند رابطه‌ای بین آن‌ها با روده را بیان کند (۵۳). این مسئله شمارش *انتروکوکوس*‌ها را به عنوان آلودگی مدفوعی بیان می‌کند و تاکید می‌کند که یافته‌های *انتروکوکوس* در غذا دقیقاً معادل با حضور مدفوع در غذا نیست. به عبارت دیگر بسیاری از غذاها طبیعتاً شامل مقدار کم یا زیاد *انتروکوکوس*‌ها به ویژه گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* هستند ( $10^1$  تا  $10^3$  cfu/g) در طیف گسترده‌ای از غذا رایج بوده و انواع مختلف پنیر و

<sup>4</sup> *Bacillus*

<sup>2</sup> *Brochothrix subspecies*

<sup>3</sup> *Vibrio cholerae*

<sup>1</sup> *clostridium botulinum*

<sup>2</sup> *clostridium perfringens*

<sup>3</sup> *Bacillus spp*

های رایج در پایش های عادی به چشم می خورد. همچنین توصیفات فنوتیپی بیان شده در گذشته همیشه با داده های آرایه شناسی متناسب نیستند. لذا برخی از اظهارات اساسی در مورد انتروکوکسی ها به چشم می خورد که از آن جمله می توان به موارد زیر اشاره کرد.

۱. انتروکوکسی ها ارگانسیم های هتروژن هستند که دارای تعدادی از ویژگی های مفید بوده همچنین پتانسیل پاتوژنیک نیز دارند.
۲. در تعدادی از فرآورده های لبنی مانند پنیرهای نیمه سخت احتمال منشاء مدفوعی انتروکوک ها زیاد است در حالی که در استارتر کالچر شیر خام این ارگانسیم ها نقش مثبتی مانند تولید باکتریوسین دارند.
۳. مطالعات بیشتر در مورد مدل های حیوانی مورد نیاز است تا پتانسیل پاتوژنیک انتروکوکسی های جداسازی شده از مواد غذایی تخمیری را نشان دهد.
۴. در نظر گرفتن این موضوع که انتروکوکسی ها به عنوان میکرو ارگانسیم های <sup>3</sup>grass نیاز به مطالعه بیشتر در مورد آنها احساس می شود اگر چه مواد غذایی شامل انتروکوکسی ها تاریخچه طولانی مصرف بدون ایجاد خطر بیماری هایی دارند.
۵. به نظر می رسد شواهد مثبتی در مورد انتروکوک ها وجود دارد که می تواند کاربرد آنها را در فرآورده های تخمیری لبنی را بیان کند. ویژگی هایی مثل کاربرد آنها در تکنولوژی لبنیات، پتانسیل پاتوژن یا مقاومت آنتی بیوتیکی که به نظر می رسد این موضوع خاص منبع اصلی جداسازی آنها می باشد. همچنین برخی از این باکتری ها ممکن است به عنوان میکرو ارگانسیم های ایمن و مفید شناخته شوند.

انتروکوکسی ها فلور طبیعی انسان بوده و می تواند به سهولت از مواد غذایی جداسازی شود. با این حال دسترسی سیستماتیک به انتروکوکسی های جداسازی شده از مواد غذایی (صنایع لبنی) هنوز کاملاً به دست نیامده است (۵۵).

### سمیت

به طور کلی محققان صنعت غذا تمایلی به پذیرش حضور انتروکوکسی ها در پنیر عمدتاً به دلیل نگرانی از وقوع برخی واکنش های بیوشیمیایی مربوط به پاتوژن های احتمالی ندارند (۵۶). و این موضوع اثبات رسیده است که در صورت ویروسی شدن انتروکوکسی فعالیت همولیتیک رخ می دهد. در میان انتروکوکسی ها سویه *انتروکوکوس فکالیس* زیرگونه *زیموژنز* و *انتروکوکوس دورانس* تنها گونه انتروکوک هستند که قادر به نمایش بتا همولیز می باشند (۵۷). بتیش<sup>۱</sup> و همکاران نشان دادند ۲۹ گونه از ۱۶۶ انتروکوکسی در صنایع لبنی تولید کننده ترمونوکلئاز هستند که اساساً مربوط به سویه انتروکوکوس فکالیس می باشد در مطالعه دیگری ۱۳ سویه از ۳۲ سویه ترمونوکلئاز مثبت بودند که زمانی که در مدل های حیوانی به کار گرفته شدند، توکسیژنیک بودند. بنابراین به نظر می رسد که توکسیژنیک بودن انتروکوکسی ها نسبت نادر بوده و نیاز به مطالعه جزئیات بیشتر در مدل های حیوانی می باشد (۵۶).

### نتیجه گیری

انتروکوکسی ها گسترده ترین باکتری های موجود در فرآورده های محصولات غذایی هستند. طبقه بندی آرایه شناسی<sup>۲</sup> بیان کننده وجود ۱۸ گونه جنس انتروکوکوس می باشد. به علت صورت گرفتن تجدید نظرهایی در ارتباط با آرایه شناسی، فقدان اطلاعات در ارتباط با گونه های مختلف انتروکوکسی های موجود در دستگاه گوارش با محیط کشت

<sup>3</sup> Generally recognized as safe

<sup>1</sup> Batish

<sup>2</sup> Taxonomy

- 1- Schleifer KH, Killper-Balz, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1984; 34:31-34.
- 2- Schleifer KH, Kilpper-Bälz. R. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. Systematic and Applied Microbiology. 1987; 10: 1-9.
- 3- Devriese LA, Pot B, Collins MD. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Bacteriology*. 1993; 75:399-408.
- 4- Siragusa GR. Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria* species by *Enterococcus hirae*. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 1992; 58:3508- 3513.
- 5- Carminati D, Giraffa G, Neviani E, Mucchetti G. Contributo allo studio della microflora di formaggi di valle Camonica: proposta per l'utilizzo di uno starter. En: L' industria del Latte. 1985; 21:3-13.
- 6- Dahlberg AC, Kosikowski, FV. The development of flavor in American Cheddar cheese made from pasteurized milk with *Streptococcus faecalis* starter. *Journal of Dairy Science*. 1948; 31:275-284.
- 7- Carini SI, I batteri lattici nella maturazione dei formaggi italiani. *Microbiologie Aliments Nutrition*. 1983; 1:35-47.
- 8- Mucchetti G, Neviani E, Todesco R, Lodi, R. Ruolo degli enterococchi nei formaggi italiani. II. Attivita caseinolitica e] ipolitica. *Latte*. 1982; 7:821-831.
- 9- Neviani E, Mucchetti G. Ruolo degli enterococchi nei formaggi italiani. III. Loro sviluppo ed attivita in formaggi a media maturazione. *Latte*. 1982; 7:902-907.
- 10- Neviani E, Mucchetti G, Contarini G, Carini, S. Ruolo degli enterococchi nei formaggi italiani. I. Loro presenza in formaggi di monte e impiego in un innesto selezionato. *Latte*. 1982; 7:722-728.
- 11- Soncini G, Piantoni L. Isolation and identification of enterococci strains in ripened Cottage cheese of the Alps. *Latte*. 1992; 60(6): 139-1141.
- 12- Garcia de Fernando GD, Hernandez PE, Burgos J, Sanz, B, Ordonez, J. Extracellular proteinase from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. I. Growth and extracellular proteinase production under different culture conditions. *Folia Microbiologica*. 1991; 36:423-428.
- 13- Carrasco de Mendoza M, Scarinci HE, Garat M, Simonetta AC. Technological properties of enterococci in lactic starters: acidifying and lipolytic activities. *Microbiologie Aliments Nutrition*. 1992; 10:289-293.
- 14- Carini S. 1983; I batteri lattici nella maturazione dei formaggi italiani. *Microbiologie Aliments Nutrition*. 1983; 1:35-47.
- 15- Tsakalidou E, Manolopoulou E, Tsilibari V, Georgalaki M, Kalantzopoulos G, Esterolytic activities of *Enterococcus durans* and *Enterococcus faecium* strains isolated from Greek cheese. *Netherland Milk Dairy Journal*. 1993; 47:145-150.
- 16- Battistotti B, Bottazzi V, Vola G. Impiego di *S. faecium*, *S. thermophilus* e bacilli lattici nella caseificazione del formaggio Fontina. *Science Technology Latt Cas*. 1977; 28:331-341.
- 17- Carminati D, Giraffa G, Neviani E, Mucchetti G. Contributo allo studio della microflora di formaggi di valle Camonica: proposta per l'utilizzo di uno starter. *Ind. Latte* 1985; 21:3-13.
- 18- Manzano M, Citterio B, Rondinini G, de Bertoldi M. Aspetti microbiologici dell'atto innesto naturale per la caseificazione de] formaggio Montasio. *Annales Microbiologia Enzimologia*. 1992; 42: 163-170.
- 19- Parente E, Villani F, Coppola R, Coppola, S. A multiple strain starter for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Lait*. 1989; 69:271-279.
- 20- Scarinci H E, Carrasco MS, Bainotti AE, Favale MS, Simonetta, AC. Growth yield of *Enterococcus faecalis* for lactic starter cultures. *Microbiologie Aliments Nutrition*. 1994; 12:43-48.
- 21- Villani E, Coppola, S. Selection of enterococcal strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Annales Microbiologia Enzimologia*. 1994; 44:97-105.
- 22- Gatti M, Fornasari E, Carminati D, Giraffa G, Neviani E. Gli enterococchi nei formaggi italiani:

- attività biochimiche esignificato tecnologico. Ind. Latte 1994; 30: 11-27.
- 23- Giraffa G, Carminati D, Neviani E. Antilisterial enterococcal bacteriocins: application in Italian soft cheese techno]-ogy. In Proceedings of the Second Workshop on Bacteriocins of LAB: Applications and Fundamentals. Banff (Canada), 17-22 April. 1995a.
- 24- Giraffa G, Picchioni N, Neviani E, Carminati D. 1995b. Production and stability of an *Enterococcus faecium* bacteriocinduring Taleggio cheesemaking and ripening. Food Microbiology.12: 301-307.
- 25- Rasouli Pirouzian H, Hesari J, Farajnia S, Moghaddam M, Ghiassifar Sh. 2009. Isolation and Identification of Dominant Strains of Enterococci in Traditional Lighvan Cheese. Food Research Journal.19 (1): 13-24.
- 26- Batish V K, Ranganathan B. Occurrence of enterococci in milk and milk products. I. Enumeration, isolation and presumptive identification of true enterococci. N.Z. Journal of Dairy Science and Technology. 1984a; 19:133-140.
- 27- Batish K, Ranganathan, B. Occurrence of enterococci in milk and milk products. II. Identification and characterization of prevalent types. N.Z. Journal of Dairy Science Technology. 1984b; 19: 189-196.
- 28-McKay AM. Antimicrobial activity of *Enterococcusfaecium* against *Listeria* spp. Lett. Applied Microbiology. 1990; 11(1): 15-17.
- 29-Arizcun C, Barcina Y, Torre P. Identification of lactic acid bacteria isolated from Roncal and Idiazabal cheeses. Lait, 1997; 77(6): 729-736.
- 30- Ashenafi M. Microbiological quality of ayib, a traditional Ethiopian cottage cheese. International Journal of Food Microbiology, 1990; 10(3-4): 263-268.
- 31- Aymerich T, Holo H, Havarstein LS, Hugas M, Garriga M, Nes IF. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. Applied and Environmental Microbiology. 1996; 62(5): 1676-1682.
- 32- Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. International Journal of Food Microbiology. 2003; 88(2-3): 215-222.
- 33- Franz C, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. *Enterococci in foods*-a conundrum for food safety. International Journal of Food Microbiology. 2003; 88(2-3): 105-122.
- 34- Perez BS, Lorenzo PL, Garcia ML, Hernandez PE, Ordonez, JA. Heat-Resistance of *Enterococci*. Milchwissenschaft-Milk Science International. 1982; 37(12): 724-726.
- 35- Garg SK, Mital BK. *Enterococci* in Milk and Milk-Products. Critical Reviews in Microbiology. 1991; 18(1): 15-45.
- 36- Hartman PA, Deibel RH, Sieverding LM. *Enterococci*, in Compendium of methods for the microbiological examination of foods, Downes FP, Ito K. Editors. American Public Health Association: Washington, D.C. 2001; 83-87.
- 37- Sorqvist S. Heat resistance in liquids of *Enterococcus* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. Acta Veterinaria Scandinavica. 2003; 44(1-2): 1-19.
- 38- Sarantinopoulos P, Andrighetto C, Georgalaki MD, Rea MC, Lombardi A, Cogan TM, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E. Biochemical properties of *enterococci* relevant to their technological performance. International Dairy Journal. 2001; 11(8): 621-647.
- 39- Centeno JA, Menendez S, Hermida M, Rodriguez-Otero JL. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. International Journal of Food Microbiology. 1999; 48(2): 97-111.
- 40- Suzzi G, Caruso M, Gardini F, Lombardi A, Vannini L, Guerzoni ME, Andrighetto C, Lanorte MT. A survey of the *enterococci* isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). Journal of Applied Microbiology. 2000; 89(2): 267-274.
- 41- Wessels D, Jooste PJ, Mostert JF. Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolates from milk and dairy products. International Journal of Food Microbiology. 1990; 10(3-4): 349-352.
- 42- Villani F, Coppola S. Selection of *enterococcal* strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. Annales Microbiologia Enzimologia. 1994; 44: 97-105.
- 43- Andrighetto C, Knijff E, Lombardi A, Torriani S, Vancanneyt M, Kersters K, Swings J, Dellaglio F. Phenotypic and genetic diversity of *enterococci* isolated from Italian cheeses. Journal of Dairy Research. 2001; 68(2): 303-316.

- 44- Aymerich T, Holo H, Havarstein LS, Hugas M, Garriga M, Nes, IF. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996; 62(5): 1676-1682.
- 45- Casaus P, Nilsen T, Cintas LM, Nes, IF, Hernandez PE, Holo H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology-Uk*, 1997; 143: 2287-2294.
- 46- Cintas LM, Casaus P, Havarstein L, Hernandez PE, Nes IF. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997; 63(11): 4321-4330.
- 47- Cintas LM, Casaus P, Holo H, Hernandez PE, Nes IF, Havarstein LS. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of Bacteriology*. 1998; 180(8): 1988-1994.
- 48- Leroy F, Foulquie Moreno MR, De Vuyst L. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; 88(2-3): 235-240.
- 49- Ennahar S, Asou Y, Zendo T, Sonomoto K, Ishizaki A. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *International Journal of Food Microbiology*. 2001; 70(3): 291-301.
- 50- Sabia C, Manicardi G, Messi P, de Niederhausern S, Bondi M. Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 2002; 75(1-2): 163-170.
- 51- Sabia C, Messi P, de Niederhausern S, Manicardi G, Bondi M. Study of two bacteriocins produced by *Enterococcus casseliflavus* and *Ent. faecalis*. *Letters in Applied Microbiology*. 2004; 38(2): 99-105.
- 52- Callewaert R, Hugas M, De Vuyst L. Competitiveness and bacteriocin production of *Enterococci* in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 2000; 57(1-2): 33-42.
- 53- Hartman PA, Deibel RH, Sieverding LM. *Enterococci*, in *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Downes FP, Ito, K, Editors. 2001; American Public Health Association: Washington, D.C. 83-87.
- 54- Maki DG, Agger WA. *Enterococcal Bacteremia* - Clinical-Features, the Risk of Endocarditis, and Management. *Medicine*, 1988; 67(4): 248-269.
- 55- Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Incidence of Hemolysin, Gelatinase, and Aggregation Substance among *Enterococci* Isolated from Patients with Endocarditis and Other Infections and from Feces of Hospitalized and Community-Based Persons. *Journal of Infectious Diseases*. 1995; 171(5): 1223-1229.
- 56- Batish VK, Chander H, Ranganathan B. Heat-Resistance of Some Selected Toxigenic *Enterococci* in Milk and Other Suspending Media. *Journal of Food Science*. 1988; 53(2): 665-666.
- 57- Brown LH, Peterson EM, Delamaza LM. Rapid Identification of *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983; 17(2): 369-370.

## ***Enterococci* isolated from dairy products: a review of its risks and technological use**

Mohammad Javad Shakouri<sup>1</sup>, **Alireza Shahab Lavasani**<sup>2\*</sup>, Atiyeh Habibi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Science and Technology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Varamin –Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

### **Abstract**

*Enterococci* are the most frequent bacterial strains in dairy products and other food products. Although they have a number of technological features such as bacteriocin production, probiotic properties and usefulness in dairy technology, there is no general agreement regarding the pathogenic risks and health threats posed by them as food pathogens. The pathogenic potential of lactic acid bacteria including enterococci in human clinical infections and their association with endocarditis has recently become a challenging issue. This study describes the available information related to microbial ecology, biochemical characteristics, production of bacteriocins against *Listeria monocytogenes* and pathogenic potential of enterococci isolated from different dairy products.

**Keywords:** Dairy products, Dairy technology, Enterococci, Pathogenic potential, Probiotics, Starter culture

---

\* shahabam20@yahoo.com