دوره پانزدهم ـ شماره ۲ ـ تابستان ۱۳۹۸
Archive of SID
DOI: 10.22055/ivj.2018.100186.1969

شناسایی خصوصیات تکنولوژیک سویه‌های *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* جدا شده از پنیر سنتی سیاهمزگی

راضیه پرتوی[۱*]، شهره عالیان‌سماک‌خواه[۲] و حمیدرضا کاظمینی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۳۰

چکیده

میکروارگانیسم‌ها و به ویژه باکتری‌های اسید لاکتیک طبیعی و یا افزوده شده به عنوان کشت آغازگر یا الحاقی بر مراحل مختلف تولید پنیر تأثیر شگرفی دارند. هدف از این مطالعه، بررسی خصوصیات تکنولوژیک سه سویه *انتروکوکوس فشیوم* (SC5, SF5, SA12) و سه سویه *انتروکوکوس دورانس* (SA25, SE16, SD18) جدا شده از پنیر سنتی سیاهمزگی، به منظور انتخاب سویه‌های مناسب از نظر تکنولوژیک برای استفاده در تهیه‌ی کشت آغازگر یا الحاقی در تولید محصولات لبنی تخمیری می‌باشد. سویه‌های مذکور از لحاظ فعالیت اسیدی کردن، فعالیت پروتئولیتیک و لیپولیتیک و سایر خصوصیات بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند. سپس، منحنی رشد سویه‌ها در شرایط محیطی مختلف رسم گردید. در بین سویه‌های مورد مطالعه، از نظر توانایی تولید اسید، پروتئولیز و لیپولیز اختلاف معنی‌داری وجود دارد. قویترین سویه از نظر کاهش pH، سویه‌ی SC5 می‌باشد. سویه‌ی SC5 با ۴/۳۵ میلی‌گرم تیروزین در ۵ میلی‌لیتر شیر و سویه‌ی SE16 با ۱۰/۳۷ واحد در دقیقه قویترین سویه‌ها به ترتیب از نظر پروتئولیز و لیپولیز می‌باشند. نتایج نشان داد که رشد در غلظت‌های ۲ و ۴ درصد نمک و pH=۹/۶، موجب آغاز رشد لگاریتمی در حدود ساعت ۴ می‌شود. در حالی که رشد در pH=۵ و غلظت ۶/۵ درصد نمک، موجب تأخیر در شروع فاز لگاریتمی (ساعت ۸) می‌گردد. نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های انتروکوکوس جدا شده از پنیر سنتی سیاهمزگی به دلیل توان پایین در کاهش pH، قابلیت استفاده به عنوان کشت آغازگر را نداشته اما به دلیل توانایی خوب پروتئولیز، لیپولیز، تولید دی استیل، عدم تولید دی اکسید کربن از گلوکز و مقاومت نسبت به شرایط نامساعد محیطی می‌توانند در کشت الحاقی، در تولید پنیر مورد استفاده قرار بگیرند. سویه‌ی SE16 با توانایی بالای پروتئولیز و لیپولیز برای این منظور پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: *انتروکوکوس فشیوم*، *انتروکوکوس دورانس*، پنیر سنتی، سیاهمزگی

مقدمه

به طور کلی تولید پنیر در دو مرحله‌ی تولید و رسیدن انجام می‌گیرد. میکروارگانیسم‌ها و به ویژه باکتری‌های اسید لاکتیک طبیعی و یا افزوده شده به عنوان کشت آغازگر یا الحاقی، بر این دو مرحله تأثیر شگرفی دارند (Piraino et al. 2008). یکی از مهم‌ترین گروه باکتری-های اسید لاکتیک، انتروکوکوس‌ها می‌باشند که در برخی از انواع پنیرها تعدادشان حتی از لاکتوکوکوس‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها بیش‌تر می‌باشد (Suzzi et al. 2000). انتروکوکوس‌ها به عنوان فلور طبیعی پنیرهای حاصل از شیر خام یا پاستوریزه شناخته شده‌اند و در فرایند رسیدن این پنیرها تأثیرگذار می‌باشند (Gardiner et al. 1999). *انتروکوکوس فشیوم* (۲۰/۵ درصد)، بیش‌ترین سویه‌ی جدا شده از لخته‌ی پنیر سفید در آب نمک بوده و *انتروکوکوس دورانس* (۱۰/۲ درصد)، پس از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در جایگاه سوم قرار دارد (Litopoulou-Tzanetaki and Tzanetakis 1992). برخی

[۱*] استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران
E-mail: r.partovi@ausmt.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] دانش‌آموخته دکترای اپیدمیولوژی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران
[۳] استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

از محققین، اثرات مثبت استفاده از *انتروکوکوس فکالیس*، *انتروکوکوس دورانس* و *انتروکوکوس فشیوم* را به عنوان بخش مهمی از کشت آغازگر در پنیرهای موزارلا، فتا، وناکو و سبریرو به اثبات رسانده‌اند (Centeno et al. 1999, Centeno et al. 1996, Saratinopoulos et al. 2002). در حالی که برخی دیگر از محققین، اثرات منفی حضور انتروکوکوس‌ها را بر خصوصیات ارگانولپتیک پنیر اثبات کرده‌اند (Teresa et al. 1995). حدود نیمی از جدایه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک از پنیر سبریرو را انتروکوکوس‌ها تشکیل می‌دهند و این جدایه‌ها نسبت به سایر باکتری‌های اسید لاکتیک، فعالیت پروتئولیتیک بیش‌تر و میزان بیش‌تری تولید اسید و دی استیل داشتند و در ایجاد طعم این پنیر از طریق فعالیت پروتئولیتیک و لیپولیتیک نقش به سزایی ایفا کردند (Centeno et al. 1996). توانایی کاهش سریع pH شیر به دلیل ایجاد لخته و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های مولد فساد و پاتوژن‌ها در تولید پنیر ضروری می‌باشد (Sarantinopoulos et al. 2001). یکی از مهم‌ترین فاکتورها برای انتخاب سویه‌های مناسب جهت استفاده در کشت آغازگر، توانایی انعقاد شیر می‌باشد (Dewan and Tamang 2007). فعالیت پروتئولیتیک و لیپولیتیک و نیز تولید دی استیل در ایجاد پنیر با طعم و عطر مطلوب نقش دارد و از مهم‌ترین خصوصیات کشت‌های الحاقی می‌باشد. کشت‌های آغازگر و الحاقی مورد استفاده در صنعت تولید پنیر، باید از مقاومت بالایی نسبت به شرایط نامساعد محیطی موجود در لخته پنیر و به ویژه پنیر رسیده برخوردار باشند.

امروزه در صنعت، به منظور کنترل روند تولید پنیرها از کشت‌های آغازگر از پیش تعیین شده با خصوصیات مطلوب استفاده می‌کنند (Piraino et al. 2008). کشت‌های آغازگر مورد استفاده در صنایع لبنی ایران وارداتی می‌باشند، از طرفی با توسعه‌ی پاستوریزاسیون و تکنیک‌های جدید تولید محصولات لبنی تخمیری به صورت صنعتی خطر از دست رفتن فلور باکتری‌های اسید لاکتیک وحشی وجود دارد. بنابراین نیاز به تولید کشت‌های آغازگر و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک غیرآغازگر که از سویه‌های بومی تشکیل شده‌اند، وجود دارد (Gardiner et al. 1999). مطالعات گذشته نشان می‌دهد که محصولات لبنی سنتی منبع فوق العاده‌ای از باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشند (Piraino et al. 2008). باکتری‌های اسید لاکتیک غیرآغازگر موجود در شیر خام و یا سایر منابع، موجب ایجاد خصوصیات مطلوب ارگانولپتیک در پنیرهای سنتی می‌شوند (Franciosi et al. 2009). برخی از محققین نشان دادند که سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از پنیرهای رسیده به دلیل تحمل محیط نامطلوب پنیر رسیده یعنی رطوبت کم، pH اسیدی، درصد نمک بالا و کمبود مواد مغذی بهتر از سویه‌های جدا شده از شیر خام، می‌توانند به عنوان کشت آغازگر و یا الحاقی مورد استفاده قرار گیرند (Franciosi et al. 2009). تا کنون مطالعات زیادی در رابطه با خصوصیات تکنولوژیک جدایه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک از پنیرهای سنتی صورت گرفته است. در این مطالعات تنوع زیاد در خصوصیات تکنولوژیک حتی در سویه‌های یک گونه مشاهده شده است (Piraino et al. 2008). پنیر سیاهمزگی یک پنیر سنتی بوده که در کشور ایران با استفاده از شیر خام گوسفند و بز و بدون استفاده از کشت آغازگر تولید می‌شود. این پنیر فرآیند رسیدن را در پوست گوسفند (خیک) به مدت ۶ ماه طی می‌کند. نویسندگان در مقاله‌ی پیشین که بر روی خصوصیات میکروبی و شیمیایی پنیر سیاهمزگی و جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و آنالیز 16s rDNA صورت گرفته بود، نشان دادند که به ترتیب ۱۳/۶ و ۳/۲ درصد جدایه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک از پنیر سیاهمزگی رسیده (۶ ماه) را *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* تشکیل داده است (Partovi et al. 2015).

هدف از این مطالعه، بررسی خصوصیات تکنولوژیک سویه‌های *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس*

www.SID.ir

Archive of SID

جدا شده از پنیر سنتی سیاهمزگی، به منظور انتخاب سویه‌های مناسب از نظر تکنولوژیک برای استفاده در تهیه‌ی کشت آغازگر یا الحاقی در تولید پنیر به ویژه پنیرهای سنتی در مقیاس صنعتی و در شرایط بهداشتی می‌باشد.

مواد و روش کار

سه سویه‌ی *انتروکوکوس فشیوم* و سه سویه‌ی *انتروکوکوس دورانس* مورد استفاده در این مطالعه از سویه‌های جدا شده از پنیر سنتی سیاهمزگی انتخاب شده‌اند و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و آنالیز 16srDNA مورد شناسایی قرار گرفتند (Partovi et al. 2015). این سویه‌ها به صورت لیوفیلیزه در بخش بهداشت مواد غذایی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران نگهداری شدند.

بررسی فعالیت اسیدی کرن سویه‌های *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* بر اساس روش IDF standard 306 در سال ۱۹۹۵ و در محیط skim milk (Merck, Darmstadt, Germany) انجام شد. ابتدا میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط skim milk ۱۰ درصد (w/v) ساخته شد و در دمای ۱۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استریل شد و تا دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد سرد شد. سویه‌های *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* به مدت ۲۴ ساعت در محیط MRS در ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شدند و سپس از این کشت باکتری به میزان ۱ درصد (v/v) به محیط skim milk تلقیح شدند و در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. pH محیط skim milk در ساعت‌های ۰ و ۲ و ۴ و ۶ و ۸ و ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ با استفاده از دستگاه pH متر (Corning M220, NY) اندازه‌گیری گردید. اسیدیته‌ی قابل تیتراسیون نیز با تیتراسیون ۱۰ میلی‌لیتر از محیط skim milk با سود یک نهم نرمال در حضور فنل فتالئین در ساعت‌های ۰ و ۲ و ۴ و ۶ و ۸ و ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ محاسبه گردید. اسیدیته‌ی قابل تیتراسیون بر حسب درجه‌ی دورنیک (حجم سود مصرفی × ۱۰) گزارش شد.

به منظور بررسی فعالیت پروتئولیتیک سویه‌های *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس*، از کشت شبانه باکتری در محیط MRS در ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده گردید. سپس سویه‌های *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* به محیط skim milk تلقیح شدند و پس از ۱۲ ساعت، فعالیت پروتئولیتیک سویه‌ها به روش تیروزین اندازه‌گیری شد (Hull 1947). فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌ها منجر به آزاد شدن اسید آمینه‌های تیروزین و تریپتوفان از شیر می‌شود که در نهایت با معرف فنل واکنش می‌دهند و رنگ آبی ایجاد می‌کنند. سپس جذب نوری محیط در طول موج ۶۵۰ نانومتر خوانده می‌شود. منحنی استاندارد تیروزین با استفاده از مقادیر متنوع تیروزین رسم شد به صورتی که جذب نوری در محور Y و میزان تیروزین بر حسب میلی‌گرم در محور X نمایش داده شد. نتایج به صورت میلی‌گرم تیروزین در ۵ میلی‌لیتر شیر گزارش شده است.

ارزیابی فعالیت لیپولیتیک سویه‌های *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* به روش Yamada و همکاران در سال ۱۹۶۲ انجام شد و سویه‌های انتروکوکوس در محیط MRS کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. این کشت باکتری در ۸۰۰۰g و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و از سوپرناتانت آن برای ارزیابی فعالیت آنزیم لیپاز استفاده شد.

بررسی توانایی تولید دی‌استیل، توسط سویه‌های *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* به صورت کیفی انجام شد (Centeno et al. 1999). تمام سویه‌ها در محیط MRS کشت داده شدند و پس از رشد کامل، به میزان ۱ درصد از این باکتری به محیط skim milk منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردیدند. سپس به ۱ میلی‌لیتر از سوپرناتانت محیط شیر، ۰/۵ میلی‌لیتر پتاس ۱۶ درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر آلفا نفتول ۱ درصد در اتانول اضافه شد و تا تشکیل هاله قرمز رنگ روی سطح محیط به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

تمام سویه‌های *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* مورد مطالعه از نظر توانایی رشد در شرایط محیطی مختلف مانند درجه‌ی حرارت‌های ۴ و ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، غلظت‌های نمک طعام ۲ و ۴ و ۶/۵ و ۸ و ۱۰ درصد و نیز pH های ۳، ۴، ۵ و ۹/۶ در طی ۷ روز در محیط MRS براس مورد بررسی قرار گرفتند. توانایی تولید دی اکسید کربن از گلوکز توسط سویه‌های *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* با استفاده از محیط فنل رد بیس براس، توانایی رشد در محیط شیر حاوی ۰/۱ و ۰/۳ درصد (w/v) متیلن بلو و نیز توان تولید آمونیوم از آرژنین در محیط مولر دکربوکسیلاز براس پس از افزودن معرف نسلر بر طبق روش Kandler و همکاران در سال ۱۹۸۶ مورد بررسی قرار گرفت.

منحنی رشد سویه‌های *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* که توانایی رشد در درجه‌ی حرارت، غلظت‌های نمک و pH های مختلف را داشتند، رسم گردید (Smetankova et al. 2012). سویه‌های انتروکوکوس در محیط MRS کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد گرم-خانه‌گذاری شدند. سپس از باکتری‌های فاز سکون برای رسم منحنی رشد استفاده گردید. به منظور رسم منحنی رشد در درجه حرارت‌های مختلف (۴، ۳۰ و ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) از محیط MRS (فاقد نمک بوده و pH آن معادل ۶/۵ می‌باشد) استفاده گردید. به منظور رسم منحنی رشد در غلظت‌های نمک مختلف (۲، ۴، ۶/۵، ۸ و ۱۰ درصد) از محیط MRS (pH آن معادل ۶/۵ می‌باشد) و در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده گردید. به منظور رسم منحنی رشد در pH های مختلف (۵ و ۹/۶) از محیط MRS (فاقد نمک می‌باشد) و در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده گردید. ۱۸۰ میکرولیتر از محیط کشت مدنظر با شرایط مذکور به هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه استریل افزوده شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (OD_{600}=0.1) با سه تکرار برای هر سویه اضافه گردید. جذب نوری این محیط‌ها در ساعت‌های ۰، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۲۱، ۲۴ و ۴۸ در طول موج ۶۳۰ نانومتر (ELISA Microplate reader, IRE96, France) خوانده شد و منحنی رشد سویه‌ها در شرایط مختلف محیطی رسم گردید. به منظور محاسبه‌ی سرعت رشد مخصوص تفاضل لگاریتم جذب نوری در ابتدا و انتهای فاز لگاریتمی در واحد زمان (ساعت) محاسبه می‌گردد (Maier 2015).

برای مقایسه‌ی میانگین تولید اسید، pH، فعالیت پروتئولیتیک، لیپولیتیک و سرعت رشد مخصوص بین سویه‌های متفاوت باکتری انتروکوکوس از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA test) و آزمون تعقیبی بونفرونی (Bonferroni) استفاده شد. برای مقایسه‌ی میانگین تولید اسید، pH، فعالیت پروتئولیتیک و لیپولیتیک بین دو گونه باکتری انتروکوکوس (فشیوم و دورانس) از آزمون آماری تی تست دو نمونه‌ای (Two sample t-test)، استفاده گردید. میزان همبستگی بین فعالیت پروتئولیتیک باکتری و pH ۷۲ ساعته و نیز سرعت رشد مخصوص باکتری در ۳۰ درجه-ی سانتی‌گراد و pH پس از ۲۴ ساعت با استفاده از آزمون همبستگی پیرسون (Pearson correlation test) محاسبه شد. تمام نتایج بر اساس میانگین و انحراف معیار بیان شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. در تمامی آنالیزها سطح معنی‌داری کم‌تر از ۵ درصد در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی خصوصیات تکنولوژیک جدایه‌ها

همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود در بین سویه‌های مختلف *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* جدا شده از پنیر سنتی سیاهمزگی از نظر کاهش pH در ساعت‌های ۸ و ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود ($P<0/05$). قوی‌ترین سویه از نظر کاهش pH سویه SC5 می‌باشد که پس از ۷۲ ساعت pH شیر را به ۵ رساند. ضعیف‌ترین سویه از نظر کاهش pH سویه SF5 می‌باشد که حتی پس از ۷۲ ساعت pH شیر را نتوانست به کم‌تر از ۶ برساند، به طوری که از ساعت ۲۴

www.SID.ir

Archive of SID

اختلاف معنی‌داری با تمام سویه‌های دیگر ایجاد کرده است (P<۰/۰۵). بین دو گونه *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* از نظر pH در زمان‌های متفاوت انکوباسیون اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P<۰/۰۵). هیچ یک از سویه‌های انتروکوکوس در این مطالعه تا ۷۲ ساعت توان منعقد کردن شیر را نداشتند.

جدول ۱: فعالیت اسیدی کردن (pH) سویه‌های انتروکوکوس جدا شده از پنیر سنتی سیاهمزگی در محیط skim milk

سویه	زمان گرمخانه گذاری (ساعت)							
	۰	۲	۴	۶	۸	۲۴	۴۸	۷۲
SC5	*۶/۵۹ ±۰/۰۱	**۶/۵۴ ±۰/۰۲	۶/۵۱ ±۰/۰۲	۶/۳۴ ±۰/۰۵	***^{ab}۶/۱۷ ±۰/۰۴	^{b}۵/۶۱ ±۰/۰۲	^{b}۵/۲۶ ±۰/۰۷	^{a}۵
SF5	۶/۵۹ ±۰/۰۲	۶/۵۸ ±۰/۰۱	۶/۵۳ ±۰/۰۲	۶/۳۸ ±۰/۰۱	^{a}۶/۲۴ ±۰/۰۷	^{a}۶/۲۱ ±۰/۰۷	^{a}۶/۱۹ ±۰/۰۴	*^{b}۶/۱۶ ±۰/۶۱
SA12	۶/۵۵ ±۰/۰۴	۶/۵۱ ±۰/۰۱	۶/۴۶ ±۰/۰۱	۶/۲۶ ±۰/۰۳	^{b}۶/۰۶ ±۰/۰۲	^{bc}۵/۶۴ ±۰/۰۲	^{c}۵/۴۱ ±۰/۰۴	^{a}۵/۱۵ ±۰/۰۱
SA25	۶/۵۹ ±۰/۰۱	۶/۵۴ ±۰/۰۱	۶/۵۲ ±۰/۰۲	۶/۳۴ ±۰/۰۲	^{ab}۶/۱۳ ±۰/۰۲	^{bd}۵/۶۹ ±۰/۰۱	^{c}۵/۴ ±۰/۰۱	^{a}۵/۱۸ ±۰/۰۱
SE16	۶/۵۴ ±۰/۰۱	۶/۵۲ ±۰/۰۲	۶/۵۱ ±۰/۰۴	۶/۲۹ ±۰/۰۴	^{b}۶/۰۹ ±۰/۰۴	^{be}۵/۶۷	^{c}۵/۴۱ ±۰/۰۱	^{a}۵/۱۴
SD18	۶/۵۹ ±۰/۰۱	۶/۵۸ ±۰/۰۲	۶/۵۲ ±۰/۰۳	۶/۳۵ ±۰/۰۲	^{a}۶/۲۵ ±۰/۰۷	^{f}۵/۹۶	^{d}۵/۸۱ ±۰/۰۷	^{c}۵/۶۴ ±۰/۰۱
P-value	۰/۲۵	۰/۱	۰/۲۶	۰/۱۳	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۲۳

* نتایج بر اساس میانگین ± انحراف معیار برای دو تکرار بیان شده است.

** ستون‌های فاقد حروف نشان‌دهنده‌ی عدم وجود معنی‌داری آماری است (P>۰/۰۵).

*** حروف الفبا متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده‌ی اختلافات معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SC5,SF5,SA12: *انتروکوکوس فشیوم*. SA25, SE16, SD18: *انتروکوکوس دورانس*.

همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود از ساعت ۶ به بعد از نظر اسیدیته اختلاف معنی‌داری در بین سویه-های مختلف *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* در محیط شیر وجود دارد (P<۰/۰۵). قوی‌ترین سویه‌ها از نظر افزایش اسیدیته سویه‌های SA12 و SE16 می‌باشند که پس از ۷۲ ساعت اسیدیته شیر را به ۵۱ درجه دورنیک رساندند. ضعیف‌ترین سویه نیز سویه‌ی SF5 می‌باشد که پس از ۷۲ ساعت اسیدیته شیر را تنها به ۳۲/۵ درجه دورنیک رساند . دو گونه *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* از نظر اسیدیته در زمان‌های متفاوت انکوباسیون اختلاف معنی‌داری نشان ندادند.

جدول ۲: فعالیت اسیدی کردن (اسیدیته) سویه های انتروکوکوس جدا شده از پنیر سنتی سیاهمزگی در محیط skim milk

سویه	زمان گرمخانه گذاری (ساعت)							
	۰	۲	۴	۶	۸	۲۴	۴۸	۷۲
SC5	*۱۶/۵±۰/۷	**۱۷	۱۹	۲۲	***^{a}۲۳/۵±۰/۷	^{a}۳۹/۵ ±۲/۱۲	^{a}۴۶/۵ ±۰/۷	^{a}۵۰
SF5	۱۷	۱۷	۱۹	۲۱	^{b}۲۱	^{b}۲۶±۱/۴۱	^{b}۲۷ ±۱/۴۱	^{b}۳۲/۵ ±۰/۷
SA12	۱۷	۱۸	۱۹	۲۱/۵ ±۰/۷	^{a}۲۳/۵ ±۰/۷	^{ab}۳۴/۵ ±۲/۱۲	^{a}۴۳/۵ ±۰/۷	^{a}۵۱ ±۱/۴۱
SA25	۱۷	۱۸/۵ ±۰/۷	۱۹/۵ ±۰/۷	۲۱/۵ ±۰/۷	^{ab}۲۲/۵ ±۰/۷	^{ab}۳۶ ±۴/۲۴	^{a}۴۳ ±۲/۸۲	^{a}۵۰ ±۱/۴۱
SE16	۱۷/۵ ±۰/۷	۱۸	۱۹	۲۲	^{a}۲۴	^{ab}۳۵/۵ ±۰/۷	^{a}۴۳	^{a}۵۱ ±۱/۴۱
SD18	۱۶/۵ ±۰/۷	۱۷/۵ ±۰/۷	۱۹	۲۱	^{ab}۲۳	^{b}۲۸	^{b}۳۲ ±۱/۴۱	^{b}۳۴/۵ ±۲/۲۱
P-value	۰/۴۳	۰/۰۷	۰/۴۸	۰/۱۵	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۱

* نتایج بر اساس میانگین ± انحراف معیار برای دو تکرار بیان شده است.

** ستون‌های فاقد حروف نشان‌دهنده‌ی عدم وجود معنی‌داری آماری است (P>۰/۰۵).

*** حروف الفبا متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده‌ی اختلافات معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SC5,SF5,SA12: *انتروکوکوس فشیوم*. SA25, SE16, SD18: *انتروکوکوس دورانس*.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: خصوصیات بیوشیمیایی سویه‌های انتروکوکوس جدا شده از پنیر سنتی سیاهمزگی

سویه	پروتئولیز (mg Tyr/5ml milk)	لیپولیز (U/min)	تولید آمونیوم از آرژنین	تولید دی استیل	تولید دی اکسید کربن از گلوکز	رشد در درجه حرارت‌های مختلف (°C)		رشد در pH های مختلف					رشد در غلظت های نمک مختلف (%w/v)					رشد در شیر حاوی ۰/۱ درصد متیلن بلو
						۴	۴۵	۳	۴	۵	۹/۶	۲	۴	۶/۵	۸	۱۰	
SC5	*a۴/۳۵±۰/۰۷	**a۷/۵۵±۰/۲۸	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SF5	۲/۳b	bc۹/۸ ±۰/۴۲	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SA12	b۲/۳۵±۰/۰۷	bc۹/۷۸ ±۰/۰۴	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−
SA25	b۲/۷ ±۱/۱۳	bc۹/۴۱ ±۰/۱۵	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SE16	ab۳/۱ ±۰/۱۴	b۱۰/۳۷±۰/۱۷	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SD18	ab۳/۴۵±۰/۰۷	c۹/۰۳ ±۰/۴	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P-value	۰/۰۳	۰/۰۱																

* نتایج بر اساس میانگین ± انحراف معیار برای دو تکرار بیان شده است.

**حروف الفبا متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده‌ی اختلافات معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SC5,SF5,SA12: *انتروکوکوس فشیوم*. SA25, SE16, SD18: *انتروکوکوس دورانس*.

تمام سویه‌های انتروکوکوس مورد مطالعه توانایی پروتئولیز داشتند . توانایی پروتئولیز سویه‌های *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* جدا شده از پنیر سنتی سیاهمزگی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان دادند (جدول ۳). سویه‌ی SC5 با ۴/۳۵ میلی‌گرم تیروزین در ۵ میلی‌لیتر شیر قوی‌ترین سویه از نظر پروتئولیز می‌باشد. اختلاف معنی‌داری در بین دو گونه *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* از نظر توانایی پروتئولیز مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در مطالعه‌ی حاضر همبستگی معنی‌داری بین توانایی پروتئولیز و pH ۷۲ ساعته سویه‌های انتروکوکوس مشاهده نشد (P=۰/۲۴).

همان طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، در بین سویه‌های *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* جدا شده از پنیر سنتی سیاهمزگی از نظر توانایی لیپولیز اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵). سویه‌ی SE16 با ۱۰/۳۷ واحد در دقیقه قوی‌ترین سویه از این نظر می‌باشد و سویه‌ی SC5 با ۷/۵۵ واحد در دقیقه ضعیف‌ترین سویه از نظر لیپولیز می‌باشد که با تمام سویه‌های دیگر اختلاف معنی‌داری ایجاد کرده است (P<۰/۰۵). اختلاف معنی‌داری در بین دو گونه *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* از نظر توانایی لیپولیز وجود ندارد (P=۰/۳۳).

تمام سویه‌های انتروکوکوس جدا شده از پنیر سیاهمزگی توان تولید آمونیوم از آرژنین و توان تولید دی استیل را دارند. هیچ یک از سویه‌های انتروکوکوس در این مطالعه دی اکسید کربن از گلوکز تولید نمی‌کنند. تمام انتروکوکوس‌های مورد مطالعه در دو دمای ۴ و ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قادر به رشد بودند . سویه‌های *انتروکوکوس دورانس* و *انتروکوکوس فشیوم* جدا شده از پنیر سیاهمزگی فاقد توان رشد در شرایط اسیدی (۴ و pH=۳) می‌باشند اما همگی در ۹/۶ و pH=۵ قادر به رشد می‌باشند . تمام سویه‌های انتروکوکوس در این مطالعه غلظت‌های نمک تا ۱۰ درصد را تحمل می‌کنند.

www.SID.ir

Archive of SID

رشد در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد (شرایط اپتیموم رشد) و نیز دمای ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد موجب تسریع در شروع رشد لگاریتمی (ساعت ۲) شده است. رشد در غلظت‌های ۲ و ۴ درصد نمک و نیز pH=۹/۶ موجب آغاز رشد لگاریتمی در حدود ساعت ۴ می‌شود، در حالی که رشد در pH=۵ و غلظت ۶/۵ درصد نمک موجب تأخیر در شروع فاز لگاریتمی (ساعت ۸) می‌گردد. همان طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود سرعت مخصوص رشد (Specific Growth Rate) در تمام سویه‌های انتروکوکوس مورد مطالعه به جز SF5 در ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد (شرایط اپتیموم رشد) با تمام شرایط محیطی برقرار شده اختلاف معنی‌داری از خود نشان داد (P<۰/۰۵). در سویه‌ی مذکور اختلاف معنی‌داری بین سرعت مخصوص رشد در ۳۰ و ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد مشاهده نشد. در تمام سویه‌های انتروکوکوس جدا شده از پنیر سیاهمزگی سرعت مخصوص رشد در pH=۵ نسبت به pH=۹/۶ کاهش معنی‌داری از خود نشان داد (P<۰/۰۵). در تمام سویه‌ها به جز سویه‌ی SF5 سرعت مخصوص رشد در غلظت‌های ۲ و ۴ درصد نمک اختلاف معنی‌داری نداشته اما این دو با غلظت ۶/۵ درصد نمک اختلاف معنی‌داری از خود نشان دادند. در سویه‌ی SF5 هر سه غلظت‌های مذکور با یکدیگر اختلاف معنی-دار داشتند. بر اساس آزمون همبستگی پیرسون بین سرعت مخصوص رشد و pH ۲۴ ساعته در بین سویه‌های انتروکوکوس مورد مطالعه همبستگی معنی‌دار مشاهده نشد (P=۰/۱۴).

جدول ۴: سرعت رشد مخصوص سویه‌های انتروکوکوس جدا شده از پنیر سنتی سیاهمزگی در شرایط مختلف محیطی

سویه	پارامتر						
	غلظت نمک			pH		دما	
	۲٪	۴٪	۶/۵٪	۵	۹/۶	°C ۳۰	°C ۴۵
SC5	[*a]۰/۰۲۳۹ ±۰/۰۰۰۳	[**a]۰/۰۲۶۶ ±۰/۰۰۱۱	[b]۰/۰۰۵۶ ±۰/۰۰۰۷	[b]۰/۰۰۳۲ ±۰/۰۰۰۴	[a]۰/۰۲۷۵ ±۰/۰۰۰۷	[c]۰/۰۶۹۲ ±۰/۰۰۴۳	[d]۰/۰۴۶۴ ±۰/۰۰۱۵
SF5	[a]۰/۰۲۹۱ ±۰/۰۰۰۶	[b]۰/۰۲۲۲ ±۰/۰۰۰۸	[c]۰/۰۰۴۷ ±۰/۰۰۰۴	[c]۰/۰۰۳۴ ±۰/۰۰۰۳	[a]۰/۰۳۰۹ ±۰/۰۰۱۴	[d]۰/۰۶۱۵ ±۰/۰۰۰۱	[d]۰/۰۵۸۵ ±۰/۰۰۲۹
SA12	[a]۰/۰۲۵ ±۰/۰۰۰۱	[a]۰/۰۲۵۷ ±۰/۰۰۰۷	[b]۰/۰۰۴۹ ±۰/۰۰۰۹	[b]۰/۰۰۳۴ ±۰/۰۰۰۸	[a]۰/۰۲۵۵ ±۰/۰۰۱	[c]۰/۰۶۸۶ ±۰/۰۰۳۲	[d]۰/۰۴۲۵ ±۰/۰۱۲۶
SA25	[a]۰/۰۲۴۳ ±۰/۰۰۹	[a]۰/۰۲۶۳ ±۰/۰۰۰۴	[b]۰/۰۰۵۶ ±۰/۰۰۰۵	[b]۰/۰۰۲۹ ±۰/۰۰۰۲	[a]۰/۰۲۷۱ ±۰/۰۰۰۱	[c]۰/۰۷۰۶ ±۰/۰۰۲۲	[d]۰/۰۳۶۳ ±۰/۰۰۸
SE16	[a]۰/۰۲۵۸ ±۰/۰۰۰۸	[a]۰/۰۲۴۳ ±۰/۰۰۱۶	[b]۰/۰۰۵۵ ±۰/۰۰۰۸	[b]۰/۰۰۴۲ ±۰/۰۰۰۴	[a]۰/۰۲۹۴ ±۰/۰۰۰۶	[c]۰/۰۶۸۹ ±۰/۰۰۴	[a]۰/۰۳۳۴ ±۰/۰۰۸۷
SD18	[a]۰/۰۲۶۳ ±۰/۰۰۰۹	[a]۰/۰۲۷۱ ±۰/۰۰۰۶	[b]۰/۰۰۵۹ ±۰/۰۰۰۳	[b]۰/۰۰۴۹ ±۰/۰۰۱۲	[a]۰/۰۲۹۱ ±۰/۰۰۰۵	[c]۰/۰۶۴ ±۰/۰۰۰۵	[d]۰/۰۵۸۸ ±۰/۰۰۲۲

* نتایج بر اساس میانگین±انحراف معیار برای سه تکرار بیان شده است.

** حروف الفبا متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلافات معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SC5,SF5,SA12: *انتروکوکوس فشیوم*. SA25, SE16, SD18: *انتروکوکوس دورانس*.

بحث

تفاوت سویه‌ها با هم در تولید اسید به توانایی آن‌ها در تجزیه‌ی مواد مغذی، استفاده از مواد مغذی و نیز سیستم-های انتقال مواد مغذی برمی‌گردد (Cheriguene et al. 2006). Cheriguene و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که بیش‌ترین تفاوت‌ها در بین باکتری‌های اسید لاکتیک از لحاظ اسیدی کردن پس از ۶ ساعت ظاهر می-شود، در حالی که در مطالعه‌ی حاضر پس از ساعت ۸ اختلاف معنی‌داری بین سویه‌های انتروکوکوس مورد مطالعه از نظر کاهش pH مشاهده شد. Sarantinopoulos و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش کردند که *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس*‌های جدا شده از منابع مختلف در طی ۶ ساعت pH محیط شیر را به حدود ۶/۳ تا ۶/۷ رساندند. همانند نتایج مطالعه‌ی حاضر، برخی دیگر از محققین به این نتیجه رسیدند که انتروکوکوس‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

تولید کننده‌های ضعیف اسید بوده و به عنوان کشت آغازگر در تولید محصولات تخمیری توصیه نمی‌شوند و برای استفاده به عنوان کشت الحاقی مناسب می‌باشند (Cheriguene et al. 2006, Sarantinopoulos et al. 2001, Abeijon et al. 2006, Perin et al. 2017). Villani و Coppola در سال ۱۹۹۴ نیز نشان دادند که *انتروکوکوس فشیوم* در طی ۶ ساعت توانست تنها ۰/۴ تا ۰/۸ واحد pH شیر را کاهش دهد. *انتروکوکوس دورانس*‌های جدا شده از شیر خام پس از ۶ ساعت pH شیر را به ۵/۵ رساندند (Franciosi et al. 2009). انتروکوکوس‌های جدا شده از پنیرهای پاستا فیلاتا تغییرات نسبتاً زیادی در pH شیر ایجاد کرده‌اند به طوری که در مدت ۲۴ ساعت ۱/۵۶ واحد کاهش pH از خود نشان دادند. این در حالی است که در مطالعه‌ی حاضر قوی‌ترین سویه پس از ۲۴ ساعت تنها ۱ واحد کاهش pH از خود نشان داد (Piraino et al. 2008). همانند نتایج مطالعه‌ی حاضر، Arizcun و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که سویه‌های *انتروکوکوس فشیوم* جدا شده از شیر و پنیرهای رونکال و ایدیازابل فعالیت اسیدی کردن ضعیفی داشتند به طوری که پس از ۶ ساعت اسیدیته‌ی شیر را به ۲۹/۱ درجه دورنیک رساندند. هیچ یک از سویه‌های انتروکوکوس در مطالعه‌ی حاضر تا ۷۲ ساعت توان منعقد کردن شیر را نداشتند.

همانند نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر، Arizcun و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که سویه‌های مختلف انتروکوکوس از نظر ویژگی‌های آنزیمی با یکدیگر متفاوت بوده و این مسئله اهمیت مطالعات بر روی هر سویه به صورت جداگانه را نشان می‌دهد. *انتروکوکوس فشیوم*‌های جدا شده از شیر بز از توان نسبتاً خوب پروتئولیز برخوردار هستند به طوری که بالاترین فعالیت پروتئولیز (۸۱/۶ میکروگرم تیروزین در میلی‌لیتر شیر) مربوط به *انتروکوکوس فشیوم* بوده است (Cheriguene et al. 2006). بر خلاف نتایج مطالعه‌ی حاضر، تعداد قابل ملاحظه‌ای از مطالعات بیانگر ضعیف بودن فعالیت پروتئولیتیک و یا فقدان این توانایی در سویه‌های انتروکوکوس می‌باشد (Sarantinopoulos et al. 2001, Suzzi et al. 2000, Franciosi et al. 2009, Dewan and Tamang 2007, Cheriguene et al. 2006). Sarantinopoulos و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که *انتروکوکوس دورانس* فعالیت پروتئولیتیک بیش‌تری از *انتروکوکوس فشیوم* از خود نشان داده است. فعالیت پروتئولیتیک (تجزیه‌ی کازئین) در ایجاد بافت و طعم مطلوب در پنیر نقش دارد، در حالی که برخی از پپتیدهای حاصل طعم تلخ داشته و اثر معکوسی بر طعم پنیر می‌گذارند (Sarantinopoulos et al. 2001, Abeijon et al. 2006). Sarantinopoulos و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که افزودن *انتروکوکوس فشیوم*‌های جدا شده از پنیر به عنوان کشت الحاقی در مراحل تولید پنیر فتا، موجب بهبود رشد باکتری‌های اسید لاکتیک غیر آغازگر و افزایش غلظت اسید آمینه‌های آزاد شده و اثرات مثبتی بر طعم، بو، رنگ و بافت پنیر فتا داشته است. همانند نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر، همبستگی بین تولید اسید و توانایی پروتئولیز در انتروکوکوس‌های جدا شده از پنیر پاستا فیلاتا وجود ندارد (Piraino et al. 2008).

سویه‌های انتروکوکوس مورد استفاده در مطالعه‌ی حاضر، فعالیت لیپولیتیک قوی دارند. نتایج ضد و نقیضی در رابطه با فعالیت لیپولیتیک انتروکوکوس‌ها وجود دارد (Villani and Coppola 1994, Macedo and Malcata 1997). برخی از محققین گزارش کرده‌اند که انتروکوکوس‌ها از نظر ویژگی لیپولیز ضعیف بوده (Suzzi et al. 2000, Soda et al. 1995) و برخی دیگر عکس این مطلب را به اثبات رسانده‌اند (Sarantinopoulos et al. 2001). فعالیت لیپولیتیک باکتری‌های اسید لاکتیک موجب تجزیه‌ی چربی شیر و تولید اسیدهای چرب و در نهایت تولید متیل کتون و تیواستر می‌شود که در ایجاد طعم پنیر نقش مهمی دارند (Sarantinopoulos et al. 2001). استفاده از *انتروکوکوس دورانس* به عنوان کشت الحاقی در تولید پنیر چدار موجب بهبود طعم پنیر و

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش غلظت اسیدهای چرب آزاد می‌شود (Jensen et al. 1975). توانایی لیپولیز باکتری‌های اسید لاکتیک اگر در شرایط درون تنی حفظ شود، می‌تواند موجب کاهش کلسترول خون شود (Omafuvbe and Enyioha 2011).

تجزیه‌ی آرژنین به آمونیوم توسط آنزیم آرژنین دآمیناز با تولید ATP همراه است. بنابراین، سویه‌هایی که توانایی متابولیزه کردن آرژنین را دارند، از این منبع انرژی به منظور رشد بهره‌مند می‌شوند (Tonon and Lonvaud-Funel 2000). توانایی تولید آمونیم از آرژنین، توسط باکتری‌های اسید لاکتیک در تعداد زیادی از مطالعات به اثبات رسیده است (Franciosi et al. 2009, Dewan and Tamang 2007, Omafuvbe and Enyioha 2011, Cheriguene et al. 2006, Piraino et al. 2008). دی استیل یک ماده‌ی طعم دهنده بوده که در نتیجه متابولیسم سیترات تولید می‌شود. *انتروکوکوس فشیوم*های با منشأ غذایی بیش‌ترین توان تولید استوئین را در بین انتروکوکوس‌های مورد مطالعه نشان دادند (Sarantinopoulos et al. 2001). این مسئله در تعدادی از مطالعات به اثبات رسیده است (Franciosi et al. 2009, Abeijon et al. 2006). Centeno و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که استفاده از انتروکوکوس‌ها به عنوان کشت الحاقی در تولید پنیر سبریرو موجب افزایش غلظت دی استیل و استوئین در این پنیر شد. Sarantinopoulos و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش کردند که ۲۳ درصد از *انتروکوکوس فشیوم*ها و ۲۷ درصد از *انتروکوکوس دورانس*های مورد مطالعه توان تولید استوئین را نداشتند. عدم توانایی انتروکوکوس‌ها در تولید دی اکسید کربن از گلوکز در مطالعاتی به اثبات رسیده است (Dewan and Tamang 2007, Omafuvbe and Enyioha 2011, Cheriguene et al. 2006)، در حالی که یک سوم سویه‌های *انتروکوکوس دورانس* جدا شده از شیر خام گاو توان تولید دی اکسید کربن از گلوکز را دارند (Franciosi et al. 2009). سویه‌هایی که موجب تولید دی اکسید کربن از گلوکز می‌شوند در تولید برخی از انواع پنیرها به دلیل ایجاد حفره و ورم کردگی کابرد ندارند (Franciosi et al. 2009). همانند نتایج مطالعه‌ی حاضر، مقاومت دمایی انتروکوکوس‌ها در تعدادی از مطالعات به اثبات رسیده است (Cheriguene et al. 2006, Franciosi et al. 2009, Piraino et al. 2008). Piraino و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که لاکتوکوکوس‌هایی که توان رشد در دمای ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد را دارند به دلیل اعمال فرایند پخت در حین تولید پنیرهای پاستا فیلاتا انتخاب می‌شوند. *انتروکوکوس دورانس*های مقاوم به دمای بالا را می‌توان در تهیه پنیر ترنتینو که مرحله پخت را در دمای ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌گذراند، استفاده نمود (Franciosi et al. 2009). همانند سویه‌های انتروکوکوس جدا شده از پنیر سنتی سیاهمزگی، مقاومت سویه‌های انتروکوکوس به pH های قلیایی (۹/۶) در برخی از تحقیقات به اثبات رسیده است (Dewan and Tamang 2007). تمام سویه‌های انتروکوکوس در مطالعه‌ی حاضر، از مقاومت فوق‌العاده‌ای نسبت به غلظت‌های نمک برخوردار هستند. *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* جدا شده از شیر بز نیز در غلظت‌های تا ۶/۵ درصد نمک رشد می‌کنند (Cheriguene et al. 2006). Partovi و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که درصد نمک در پنیر سیاهمزگی تا ۵/۲۲ درصد می‌باشد. برخی از محققین گزارش کردند که تحمل غلظت‌های نمک (۲ تا ۱۰ درصد) در لاکتوکوکوس‌ها نشان‌دهنده‌ی آداپته شدن با شرایط مختلف محیطی در حین تولید پنیر (درصد بالای نمک در آب نمک مورد استفاده در تهیه پنیرهای سنتی) می‌باشد (Piraino et al. 2005).

سرعت رشد مخصوص، به عنوان یک مقیاس کمی، از افزایش رشد باکتری‌ها در واحد زمان به کار می‌رود. براساس مطالعات نویسندگان، تا کنون تحقیقی در رابطه با بررسی سرعت رشد مخصوص انتروکوکوس‌ها در شرایط محیطی مختلف صورت نگرفته است. Morandi و همکارارن در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که سرعت تکثیر و تطبیق با شرایط محیطی نامطلوب (دمای پایین و اسیدیته)

www.SID.ir

Archive of SID

در *انتروکوکوس فشیوم* کم‌تر از *انتروکوکوس فکالیس* می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر تفاوت معنی‌داری بین سرعت رشد مخصوص دو گونه *انتروکوکوس فشیوم* و *انتروکوکوس دورانس* در شرایط مختلف محیطی مشاهده نشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های انتروکوکوس جدا شده از پنیر سنتی سیاهمزگی قابلیت استفاده به عنوان کشت آغازگر را نداشته اما به دلیل توانایی خوب پروتئولیز، لیپولیز، تولید دی استیل، عدم تولید دی اکسید کربن از گلوکز و مقاومت نسبت به شرایط نامساعد محیطی می‌توانند در کشت الحاقی در تولید پنیر مورد استفاده قرار بگیرند. به نظر می‌رسد این سویه‌ها می‌توانند در ایجاد طعم پنیر نقش به سزایی داشته باشند. سویه‌ی SE16 با توانایی بالای پروتئولیز و لیپولیز برای این منظور پیشنهاد می‌گردد. اثر استفاده از انتروکوکوس‌های جدا شده از پنیر سنتی سیاهمزگی در کشت الحاقی در تولید پنیر سیاهمزگی و سایر انواع پنیرهای سنتی در شرایط کنترل شده، باید در مقیاس آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه‌ی پژوهشی (گرنت) دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام گردیده است.

منابع

Abeijón, M.C.; Medina, R.B.; Katz, M.B. and González, S.N. (2006). Technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from ewe's milk and cheese with importance for flavour development. Canadian Journal of Microbiology, 52(3): 237-245.

Arizcun, C.; Barcina, Y. and Torre, P. (1997). Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiaza´bal cheese. International Journal of Food Microbiology, 38(1): 17-24.

Centeno, A.; Menéndez, S. and Rodríguez-Otero, J.L. (1996). Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). International Journal of Food Microbiology, 33(2-3): 307-313.

Centeno, J.A.; Menendez, S.; Hermida, M. and Rodríguez-Otero, J.L. (1999). Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. International Journal of Food Microbiology, 48(2): 97-111.

Cheriguene, A.; Chougrani, F. and Bensoltane, A. (2006). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian goat's milk. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9(7): 1242-1249.

Dewan, S. and Tamang, J.P. (2007). Dominant lactic acid bacteria and their technological properties isolated from the Himalayan ethnic fermented milk products. Antonie van Leeuwenhoek, 92(3): 343-352.

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

Gardiner, G.E.; Ross, R.P.; Wallace, G.M.; Scanlan, F.P.; Jagers, P.P.G.M.; Fitzgerald, G.F. et al. (1999). Influence of a Probiotic Adjunct Culture of *Enterococcus faecium* on the Quality of Cheddar Cheese. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(12): 4907-4916.

Hull, M.E. (1947). Studies on milk protein colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. Journal of Dairy Science. 30, 881-884.

IDF. (1995). Bulletin IDF 306 - IDF guideline-determination of acidifying activity of dairy cultures. International Dairy Federation, Brussels, Belgium. Pp: 32-36.

Jensen, J.P, Reinbold, G.W.; Washam, C.J. and Vedamuthu, E.R. (1975). Role of Enterococci in Cheddar Cheese: Proteolytic Activity and Lactic Acid Development. Journal of Milk and Food Technology, 38(1): 3-7.

Kandler, O. and Weiss, N. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In: Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (1986). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, Pp: 1209-1235.

www.SID.ir

Archive of SID

Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N. (1992). Microbiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. Food Microbiology, 9(1): 13-19.

Macedo, A.C. and Malcata, F.X. (1997). Role of adventitious microflora in proteolysis and lipolysis of Serra cheese: preliminary screening. European Food Research and Technology, 205(1): 25-30.

Maier, R.M. Bacterial Growth. In: Maier, R.M.; Pepper, I.L.; Gerba, C.P. (2015). Environmental Microbiology. 3rd ed. Academic Press, Elsevier, Pp: 39-45.

Morandi, S.; Brasca, M.; Alfieri, P.; Lodi, R.; Tamburini, A. (2005). Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. Lait, 85(3), 181-192.

Omafuvbe, B.O. and Enyioha, L.C. (2011). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from selected commercial Nigerian bottled yoghurt. African Journal of Food Science, 5(6), 340-348.

Partovi, R.; Gandomi, H.; Akhondzadeh Basti, A.; Noori, N.; Nikbakht Borujeni, G.H. and Kargozari, M. (2015). Microbiological and chemical properties of Siahmazgi cheese, an Iranian artisanal cheese: isolation and identification of dominant lactic acid bacteria. Journal of Food Processing and Preservation, 39(6): 871-880.

Perin, L.M.; Belviso, S.; Bello, B.D.; Nero, L.A. and Cocolin, L. (2017). Technological properties and biogenic amines production by bacteriocinogenic Lactococci and Enterococci strains isolated from raw goat's milk. Journal of Food Protection, 80(1): 151-157.

Piraino, P.; Zotta, T.; Ricciardi, A. and Parente, E. (2005). Discrimination of commercial Caciocavallo cheeses on the basis of the diversity of lactic microflora and primary proteolysis. International Dairy Journal, 15(11): 1138-1149.

Piraino, P.; Zotta, T.; Ricciardi, A.; Mcsweebwy, P.L.H. and Parente, P. (2008). Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteriaisolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study. International Dairy Journal, 18(1): 81-92.

Sarantinopoulos, P.; Andrighetto, C.; Georgalaki, M.D.; Rea, M.C.; Lombardi, A.; Cogan, T.M. et al. (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. International Dairy Journal, 11(8): 621-647.

Sarantinopoulos, P.; Kalantzopoulos, G. and Tsakalidou, E. (2002). Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. International Journal of Food Microbiology, 76(1-2): 93-105.

Smetankova, J.; Hladikova, Z.; Valach, F.; Zimanova, M.; Kohajdova, Z.; Greif, G. and Greifova, M. (2012). Influence of aerobic and anaerobic conditions on the growth and metabolism of selected strains of *Lactobacillus plantarum*. Acta Chimica Slovaca, 5(2): 204-210.

Soda, M.E.; Law, J.; Tsakalidou, E. and Kalantzopoulos, G. (1995). Lipolytic activity of cheese related microorganisms and its impact on cheese flavor. Developments in Food Science, 37: 1823-1847.

Suzzi, G.; Caruso, M.; Gardini, F.; Lombardi, A.; Vannini, L.; Guerzoni, M.E.; Andrighetto, C. and Lanorte, M.T. (2000). A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italiangoat's cheese (semicotto caprino). Journal of Applied Microbiology, 89(2): 267-274.

Teresa, L.; Jesus, S.; Gonzalez, C.J.; Bellymar, M. and Garcia, M.L. (1995). Bacteriological quality of a traditional spanish blue cheese. Milchwissenschaft, 50(9): 503-505.

Tonon, T. and Lonvaud-Funel, A. (2000). Metabolism of arginine and its positive effect on growth and revival of *Oenococcus oeni*. Journal of Applied Microbiology, 89(3): 526-531.

Villani, F. and Coppola, S. (1994). Selection of enterococcal strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. Annali di microbiologia ed enzimologia, 44(1): 97-105.

Yamada, K.; OTA, U. and Machida, H. (1962). Studies on the production of lipase bymicroorganisms. Quantitative determination of lipase. Agricultural and Biological Chemistry, 36(10): 860-864.

www.SID.ir

Archive of SID

Characterization of technological properties of *E. faecium* and *E. durans* strains isolated from Siahmazgi traditional cheese

Partovi, R.[1]; Alian Samakkhah, Sh.[2] and Kazemeini, H.R.[1]

Received: 07.10.2017 Accepted: 20.06.2018

Abstract

Microorganisms especially wild or added lactic acid bacteria as a starter or adjunct culture have a significant effect on different stages of cheese production. The aim of this study was to evaluate technological properties of 3 strains of *E. faecium* (SC5, SF5, SA12) and 3 strains of *E. durans* (SA25, SE16, SD18) isolated from Siahmazgi cheese in order to select suitable microorganisms regarding technological properties to be used as starter or adjunct culture in the production of fermented dairy products. The strains were evaluated regarding acidifying activity, proteolysis and lipolysis ability and also other biochemical properties. Then the growth curve of the strains was drawn at different environmental conditions. There was a significant difference in relation to acid production, proteolysis and lipolysis ability between Enterococcus strains. The strongest strain in relation to pH reduction was SC5. SC5 and SE16 strains were the strongest strains in relation to proteolysis (4.35 mg Tyr/5 ml milk) and lipolysis (10.37 U/min), respectively. The results showed that growth at salt concentrations (2% and 4%) and also pH=9.6 induced log phase to be started at hour 4, but growth at pH=5 and 6.5% salt concentration induced log phase to be started with delay (hour 8). The results showed that Enterococcus strains isolated from Siahmazgi cheese cannot be used as starter culture because of weakness in pH reduction, but due to proteolysis and lipolysis activity, inability to produce gas from glucose, diacetyl production, and resistance to diverse environmental conditions (SE16 strain) can be used as an adjunct culture.

Key words: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, Traditional cheese, Siahmazgi cheese

1- Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
2- PhD Graduated of Epidemiology, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
Corresponding Author: Partovi, R., E-mail: r.partovi@ausmt.ac.ir

www.SID.ir