Archive of SID

مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۹ شماره ۳/ سال ۱۳۹۸/ صفحات ۱۳ تا ۲۶

پتانسیل پروبیوتیکی انتروکوکوس‌های جدا شده از شیر خام و فرآورده‌های لبنی سنتی منطقه تبریز

نوشین پیروزپور[۱] و شهرام حنیفیان[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲۸

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
[۲]دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
[*]مسئول مکاتبه: Email: hanifian@iaut.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: پروبیوتیک‌ها ارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که دارای اثرات سلامت‌بخش برای میزبان می‌باشند. **هدف**: هدف از انجام این پژوهش جداسازی گونه‌های متنوع انتروکوکوس از شیر خام و فرآورده‌های لبنی سنتی منطقه تبریز و بررسی پتانسیل پروبیوتیکی آن‌ها بود. **روش کار**: انتروکوکوس‌ها با روش کشت جداسازی و با آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. ویژگی‌های پروبیوتیکی جدایه‌ها (تحمل به اسید و صفرا، فعالیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی، حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها و ژن عامل حدت) ارزیابی گردید و ۲٤ جدایه با در نظر گرفتن تنوع گونه‌ای و نوع فرآورده لبنی انتخاب شدند. **نتایج**: هیچ‌یک از گونه‌های انتروکوکوس به pH های ۱ و ۲ تحمل نداشتند، اما تمامی آن‌ها در pH= ۳ توانستند به‌مدت ۱۲۰ دقیقه پایدار بمانند. از نظر تحمل صفرا، همه گونه‌ها نسبت به درصدهای مختلف صفرا مقاوم بودند، اما به‌موازات افزایش غلظت صفرا، کاهش بیشتر در جمعیت آن‌ها مشاهد شد. به‌علاوه، درجات مختلفی از پروتئولیز و لیپولیز توسط گونه‌های متنوع و سویه‌های مختلف یک گونه انتروکوکوس به‌دست آمد. بیش‌ترین فعالیت پروتئولیتیکی بعد از ۱۵ روز ثبت گردید که مربوط به گونه‌های *فکالیس*، *ماندتی* و *هایرا* و بیش‌ترین فعالیت لیپولیتیکی مربوط به گونه‌های *ساکارولیتیکوس*، *کازلیفلاووس* و *فکالیس* بودند. هم‌چنین در آنتی‌بیوگرام درجات متفاوتی از حساسیت مشاهده شد. ژن حدت *Esp* از دو سویه *فکالیس* ردیابی شد، در حالی‌که ژن حدت *Asa 1* در هیچ‌یک از سویه‌های *فاسیوم* یافت نشد. **نتیجه‌گیری نهایی**: گونه‌های انتروکوکوس می‌توانند به‌صورت بالقوه به‌عنوان پروبیوتیک مطرح باشند اما ضروری است ارزیابی‌های مولکولی و هم‌چنین آزمون‌هایی در مدل‌های سلولی و حیوانی برای ارزیابی دقیق‌تر جنبه‌های ایمنی انتروکوکوس‌ها انجام گیرد.

واژگان کلیدی: انتروکوکوس، محصولات لبنی سنتی، تحمل اسید، تحمل صفرا، فعالیت پروتئولیتیکی، فعالیت لیپولیتیکی

مقدمه

پروبیوتیک‌ها در اصطلاح به ارگانیسم‌های زنده‌ای اطلاق می‌شوند که در صورت مصرف به‌میزان لازم، دارای اثرات سلامت‌بخش بر روی بدن میزبان می‌باشند. اهمیت این میکروارگانیسم‌ها و خواص سلامت‌بخش آن‌ها منجر به افزایش محصولات جدید فراسودمند از

www.SID.ir

Archive of SID

جمله فرآورده‌های پروبیوتیک گردیده است (ولگموث و همکاران ۲۰۱۰). باکتری‌های پروبیوتیک به‌عنوان مکمل‌های غذایی زنده میکروبی تعریف می‌شوند که به‌طور مفید با اصلاح تعادل میکروبی، روده میزبان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (دوراک و همکاران ۲۰۱۸). ویژگی‌های بیولوژیکی پروبیوتیک‌ها شامل مقاومت به اسید، صفرا، پپسین، تریپسین و تولید اسیدهای آلی، فعالیت ضدمیکروبی و توانایی چسبیدن به سلول‌های مخاطی می‌باشد (اوگی‌یر و سرور ۲۰۰۸). باکتری‌های پروبیوتیکی متعلق به باکتری‌های مولد اسید لاکتیک هستند و غالباً جنس‌های لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس و بیفیدوباکتریوم را شامل می‌شوند؛ از سوی دیگر باکتری‌های غیرمتعارف دیگری نظیر انتروکوکوس‌ها در این دسته‌بندی جای می‌گیرند که به‌عنوان باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک غیراستارتری[1] مطرح هستند. این گونه‌ها به‌طور متداول در انواع مختلف پنیر سنتی یافت می‌شوند و فعالیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی آن‌ها باعث افزایش و بهبود طعم مواد غذایی از جمله پنیرهای سنتی می‌شود (مارتینو و همکاران ۲۰۱۸).

انتروکوکوس‌ها کوکسی‌های گرم مثبت، فاقد اسپور و بی‌هوازی اختیاری هستند که زیستگاه غالب آن‌ها دستگاه گوارش انسان و حیوانات خونگرم می‌باشد. انترکوکوس‌ها دارای ویژگی‌هایی از جمله متحمل بودن گرما، مقاومت به ٦/٥ درصد نمک و شرایط قلیایی (٩/٦ =pH) و توانایی رشد در دمای ٥ تا ٥٠°C هستند. به‌علاوه، انتروکوکوس‌ها عموماً در شیر خام و محصولات لبنی تخمیری سنتی وجود دارند و شیر یک منبع ایده‌آل برای رشد این ارگانیسم‌هاست (دومینگ و همکاران ۲۰۰۳؛ اسوک و فرانز ۲۰۱٤). بسیاری از گونه‌های انتروکوکوس دارای فعالیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی هستند و موجب طعم ویژه در پنیرهای سنتی می‌شوند. برخی از سویه‌های انتروکوکوس با منشأ محصولات لبنی، در حین رشد در مواد غذایی علیه باکتری‌های بیماری‌زایی هم‌چون *لیستریا مونوسایتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *ویبریو کلرا*، گونه‌های کلستریدیوم و باسیلوس تولید باکتریوسین می‌کنند (اولوئرا-گارسیا و همکاران ۲۰۱۸). این مشخصات انتروکوکوس‌ها را گزینه‌های مناسبی برای پروبیوتیک بودن مطرح می‌کنند؛ با این وجود انتروکوکوس‌ها جزو میکروب‌های GRAS[2] نیستند. بنابراین وجود این باکتری‌ها در محصولات لبنی در عین مفید بودن، ممکن است مخاطراتی در پی داشته باشند (اوگی‌یر و سرور ۲۰۰۸).

بر اساس بررسی‌های انجام گرفته، تاکنون گونه‌های مختلفی از باکتری‌ها به‌عنوان گونه‌های پروبیوتیک معرفی شده‌اند اما بیشتر پروبیوتیک‌های معرفی شده مربوط به جنس‌های لاکتوباسیلوس و لاکتوکوکوس بوده‌اند. در همین راستا مطالعاتی بر روی برخی از فرآورده‌های سنتی ایرانی صورت گرفته است (نریمانی و تاری‌نژاد ۱۳۹۳) و کمتر جنس انتروکوکوس و به‌ویژه سویه‌های بومی جداشده از فرآورده‌های سنتی مورد توجه قرار گرفته است. هدف این مطالعه جداسازی و شناسایی انتروکوکوس‌ها از شیر خام و فرآورده‌های لبنی سنتی منطقه تبریز و ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی آن‌ها بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی انتروکوکوس

نمونه‌گیری از شیر خام و فرآورده‌های لبنی سنتی عرضه شده در منطقه تبریز انجام شد. برای این کار ۷۰ نمونه شامل شیر خام، پنیر، کشک، دوغ، خامه، کره و ماست (از هر کدام ۱۰ نمونه) جمع‌آوری و در شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل گردید. مقدار ۱۰ گرم از نمونه مورد نظر با ۹۰ میلی‌لیتر سرم رینگر استریل مخلوط شد و به‌مدت ٥ دقیقه در بن‌ماری ٤٠ °C قرار گرفت. سپس به‌مدت ۲ دقیقه در شیکر با شدت ۲۳۰ rpm همگن

[1] Non-Starter Lactic Acid Bacteria (NSLAB)

[2] Generally Recognized as Safe

www.SID.ir

Archive of SID

گردید (کولومان و همکاران ۲۰۰۹). مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های تهیه شده (و در مورد نمونه‌های دوغ بدون رقیق‌سازی) در محیط کانامایسین اسکولین آزاید آگار[1](Merck, Germany) کشت سطحی داده شدند. محیط‌های کشت در دمای ۴۲ °C و شرایط هوازی به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید (دومینگ و همکاران ۲۰۰۳). کلنی‌های با قطر ۲-۱ میلی‌متر و دارای هاله سیاه انتخاب و جهت انجام آزمون‌های غربال‌گری و افتراقی در محیط جامد عمومی عصاره قلب و مغز[2](Scharlau, Spain) کشت (۳۷ °C به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت) داده شد (گارسیو-کانو و همکاران ۲۰۱۴).

برای شناسایی جنس انتروکوکوس از آزمون‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی متداول شامل توانایی رشد در ۴۲ °C، رنگ‌آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، بررسی مورفولوژی باکتری، رشد در حضور ۶/۵ درصد نمک و توانایی هیدرولیز بایل اسکولین استفاده گردید. در ادامه با آزمون‌های حرکت، تولید H_2S، تولید رنگدانه زرد، تخمیر قندها (L-آرابینوز، مانیتول، D-رافینوز، ساکارز و لاکتوز)، توانایی رشد در دمای ۴ °C، هیدرولیز آرژنین، تحمل تلوریت پتاسیم (۰/۰۴ درصد) و قابلیت همولیز، تشخیص تفریقی گونه‌های انتروکوکوس انجام پذیرفت (گوستاوو و همکاران ۲۰۰۹).

مقاومت به اسید

جدایه‌های انتروکوکوس در ام‌آراس براث[3](Scharlau, Spain) کشت (۲۴ ساعت و ۳۷ °C) و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴ °C با شدت ۴۰۰۰ ×g رسوب داده شدند. مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از رسوب به لوله‌های حاوی ۲ میلی‌لیتر PBS استریل با pH های ۱، ۲ و ۳ (با استفاده از اسیدکلریدریک) اضافه و مخلوط گردید. سپس لوله‌ها به‌مدت ۱۲۰ دقیقه در ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شدند. در زمان صفر و هم‌چنین زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه، از نمونه‌های مزبور رقت‌های سریال تهیه و از هر رقت مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در ام‌آراس آگار (Scharlau, Spain) کشت داده شد و پس از گرمخانه‌گذاری (به‌مدت ۲۴-۴۸ ساعت در ۳۷ °C)، جمعیت باکتری‌های زنده شمارش گردیدند (لی و همکاران ۲۰۱۵).

مقاومت به نمک‌های صفراوی

جدایه‌های انتروکوکوس با تعداد تقریبی ۹ log cfu/ml در محیط ام‌آراس براث حاوی ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ یا ۰/۴ درصد نمک‌های صفراوی، کشت داده شدند و متعاقب گرمخانه‌گذاری (در دمای ۳۷ °C به‌مدت ۲۴ ساعت)، رقت‌های سریال تهیه و انتروکوکوس‌های زنده و مقاوم به صفرا در محیط کشت ام‌آراس آگار شمارش گردید (لی و همکاران ۲۰۱۵).

فعالیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی

برای بررسی فعالیت پروتئولیتیکی جدایه‌ها از کشت‌های خالص و جوان انتروکوکوس به‌صورت نقطه‌ای در محیط اسکیم‌میلک آگار[4] (Merck, Germany) کشت داده شد و به‌مدت ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در ۳۰ °C و در ادامه ۷ و ۱۵ روز در ۱۰ °C رشد داده شدند. پس از هر دوره زمانی، اندازه قطر هاله پیرامون نقطه کشت ثبت گردید. برای ارزیابی فعالیت لیپولیتیکی، از کشت‌های جوان انتروکوکوس به‌صورت نقطه‌ای در محیط کشت تری‌بوتیرین آگار[5](Merck, Germany) کشت داده شد و به‌مدت ۵ روز در دمای ۳۰ °C گرمخانه‌گذاری شد. برای قرائت نتیجه ابتدا سطح محیط کشت با سولفات‌مس اشباع پوشانده شد. سپس اندازه قطر هاله لیپولیز در پیرامون نقطه کشت بررسی گردید (سریو و همکاران ۲۰۱۰).

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

برای این آزمایش از روش انتشار دیسکی[6]استفاده شد. ابتدا از کشت‌های جوان انتروکوکوس کدورتی معادل

[1] Kanamycin Esculin Azide agar
[2] Brain Heart Infusion (BHI) agar
[3] DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS) broth
[4] Skim milk agar
[5] Tributyrin agar
[6] Kirby-Bauer disc diffusion

www.SID.ir

Archive of SID

استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند تهیه گردید. مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون بر روی محیط کشت مولر–هینتون آگار[1] (Merck, Germany) کشت سطحی داده شد و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (پادتن‌طب، ایران) ونکومایسین (۳۰ µg)، تتراسایکلین (۳۰ µg)، استرپتومایسین (µg ۱۰)، اریترومایسین (۱۵ µg)، آمپی‌سیلین (۱۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، پنی‌سیلین (۱۰ U) و کلرامنفیکل (۳۰ µg) در سطح محیط جای‌گذاری و پس از گرمخانه‌گذاری به‌مدت ۴۸–۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C، قطر هاله عدم رشد در پیرامون دیسک‌ها اندازه‌گیری و تفسیر گردید (کلین ۲۰۰۳؛ ویکلر و همکاران ۲۰۰۷).

ژن‌های حدت

جدایه‌های انتروکوکوس در محیط لوریا–برتانی براث (Merck, Germany) تجدید کشت (۲۴ ساعت و ۳۷ °C) یافتند و سلول‌های باکتریایی با سانتریفیوژ رسوب داده شدند. با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت (Sinaclon, Iran) و طبق دستورالعمل کیت، DNA ژنومی استخراج گردید. پس از تعیین غلظت و خلوص DNA با استفاده از نانودراپ (Thermo, USA)، واکنش PCR مطابق با یک روش قبلی و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های *Esp* و *Asa1* انجام گرفت و محصول PCR به‌ترتیب با اندازه‌های ۵۱۰ و ۳۷۵ جفت‌باز با ژل‌الکتروفورز بررسی شد (وانکرکهوون و همکاران ۲۰۰۴).

آنالیز آماری

تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند و آمار توصیفی داده‌ها (میانگین و انحراف معیار) محاسبه شد. سپس نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون اسکوونس و کورتوزیس[2] ارزیابی گردید. تفاوت مقاومت به اسید، مقاومت به صفرا و هم‌چنین فعالیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی جدایه‌های انتروکوکوس با آنالیز واریانس یک‌طرفه[3] در سطح احتمال ۵ درصد ارزیابی گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار (Version 20) SPSS، انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

از نمونه‌های مورد آزمایش گونه‌های متنوعی از انتروکوکوس جداسازی شد. در این میان گونه‌های *فکالیس* و *فاسیوم* از فراوانی بسیار بیشتری برخوردار بودند. با توجه به این‌که هدف مطالعه ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی گونه‌های انتروکوکوس بود، تنوع گونه‌ای و منشأ جداسازی باکتری (نوع فرآورده لبنی) معیار انتخاب سویه‌ها در نظر گرفته شد. از این‌رو ۲۴ جدایه متشکل از ۶ گونه *فاسیوم*، ۵ گونه *فکالیس*، ۴ گونه *گالیناروم*، ۲ گونه *کازلیفلاووس*، ۲ گونه *آویوم*، ۲ گونه *ماندتی* و ۱ جدایه از هر یک از گونه‌های *هایرا*، *ساکارولیتیکوس* و *رافینوسوس* برای ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی انتخاب شدند.

بر اساس یافته‌های مقاومت به اسید، هیچ‌یک از ۲۴ جدایه انتروکوکوس در pH های ۱ و ۲ مقاوم نبودند و در زمان ۳۰ دقیقه، به کم‌تر از حد قابل ردیابی (log cfu/ml ۲ >) رسیدند؛ اما در pH= ۳ به‌جز دو سویه *فاسیوم* (جدا شده از کشک و خامه)، سایر جدایه‌ها شرایط اسیدی را تا انتهای دوره تحمل نمودند. با این توضیح که کاهش جمعیت اغلب جدایه‌های انتروکوکوس در طی ۱۲۰ دقیقه، جزئی و به لحاظ آماری غیرمعنادار بود و صرفاً جمعیت ۹ جدایه به‌صورت معنادار (P<۰/۰۵) کاهش پیدا کرد؛ با این وجود در پایان ۱۲۰ دقیقه، تعداد قابل‌توجهی (بیش از log cfu/ml ۸/۵) از جمعیت این جدایه‌ها باقی ماندند که بیانگر مقاومت بالای گونه‌های انتروکوکوس به شرایط اسیدی است (جدول ۱). طبق نتایج مطالعه حاضر، تفاوت‌هایی در مقاومت به اسید در بین گونه‌های مختلف انتروکوکوس و سویه‌های یک گونه مشاهده شد که از نظر آماری معنادار (P<۰/۰۵) بودند. هر چند بخشی از این تفاوت،

[1] Muller-Hinton agar
[2] Skewness and Kurtosis
[3] One-Way ANOVA

www.SID.ir

Archive of SID

به اختلاف در جمعیت اولیه انتروکوکوس‌ها در زمان تلقیح (زمان صفر) مربوط می‌شود.

جدول ۱- تغییرات (میانگین±انحراف معیار) جمعیت (log cfu/ml) گونه‌های انتروکوکوس در شرایط اسیدی (pH= ۳)

Table 1- Variation (mean±SD) in the population of Enterococcus spp. (log cfu/ml) in acidic (pH= 3) condition

Enterococcus species	Isolate	Source	Time (min)			
			0	30	60	120
faecium	1	yogurt	10.31± 0.55 aB	10.26± 0.37 aBC	10.12± 0.41 aB	10.02± 0.50 aC
	2	cheese	9.11± 0.24 aAB	9.09±0.19 aAB	8.86± 0.33 aA	8.39± 0.47 aB
	3	butter	10.01± 0.44 aB	9.95± 0.19 aB	9.91± 0.39 aB	9.71± 0.50 aC
	4	Kashk	10.26± 0.31 bB	10.11± 0.16 bBC	10.03± 0.35 bB	ND *aA
	5	cream	9.35±0.47 bAB	9.23±0.36 bAB	9.11± 0.40 bAB	ND *aA
	6	raw milk	8.92±0.61 aA	8.79±0.54 aA	8.73± 0.49 aA	8.36± 0.38 aB
faecalis	1	cheese	10.05± 0.18 aB	10.07±0.31 aBC	10.07± 0.24 aB	9.89± 0.48 aC
	2	butter	10.30± 0.20 bB	10.10± 0.35 bBC	9.87± 0.44 abB	9.02± 0.52 aBC
	3	buttermilk	11.35± 0.57 bC	11.05± 0.33 abC	10.90± 0.45 abB	10.07± 0.27 aCD
	4	cream	10.31±0.17 aB	10.29± 0.24 aBC	10.21± 0.13 aB	10.14± 0.24 aCD
	5	raw milk	10.34± 0.28 aB	10.19± 0.34 aBC	10.02± 0.12 aB	9.86± 0.35 aC
gallinarum	1	cream	10.05± 0.22 bB	9.99± 0.19 abB	9.93± 0.24 abB	9.07± 0.30 aBC
	2	butter	10.29± 0.21 aB	10.14± 0.17 aBC	9.97± 0.37 aB	9.79± 0.29 aC
	3	cheese	10.25± 0.26 bB	9.56± 0.32 abAB	9.20± 0.21 aAB	8.69± 0.42 aB
	4	raw milk	10.27± 0.36 bB	9.77± 0.26 abAB	9.54± 0.38 abAB	9.04± 0.47 aBC
casseliflavus	1	cream	10.27± 0.24 aB	9.79± 0.31 aAB	9.61±0.22 aAB	9.43± 0.42 aC
	2	raw milk	10.15± 0.31 aB	9.79± 0.27 aAB	9.57± 0.44 aAB	9.32± 0.47 aBC
avium	1	cheese	10.27± 0.35 aB	9.70± 0.23 aAB	9.67± 0.15 aAB	9.44± 0.50 aC
	2	cream	10.0± 0.46 bB	9.17± 0.39 abAB	9.04±0.28 abAB	8.60± 0.57 ac
mundtii	1	buttermilk	10.03±0.41 aB	10.01± 0.37 aB	9.86± 0.44 aB	9.50± 0.27 aC
	2	raw milk	10.0±0.38 aB	9.77± 0.30 aAB	9.69± 0.45 aAB	9.61± 0.29 aC
hirae	1	raw milk	10.18±0.17 bB	9.99± 0.27 abB	9.11± 0.38 aAB	9.04± 0.41 aBC
saccharolyticus	1	raw milk	10.29±0.22 aB	10.09± 0.30 aB	10.01± 0.15 aB	9.92± 0.45 aC
raffinosus	1	raw milk	10.27± 0.17 aB	10.17± 0.30 aBC	10.08± 0.26 aB	10.01± 0.35 aC

*ND: Below the detection limit (< 2 log cfu/ml); a, b: Different letters indicate significant (P<0.05) difference among mean values in each raw. A, B, C, D: Different letters indicate significant (P<0.05) difference among mean values in each column.

این یافته نشان‌دهنده تفاوت رفتار و مقاومت سویه‌های مختلف یک گونه نسبت به شوک اسیدی است. نتایج تحقیق حاضر هم‌راستا با یافته‌های برخی تحقیقات مشابه بود؛ به این معنی که همه گونه‌ها فقط در pH= ۳ پایدار بودند (لی و همکاران ۲۰۱۵). هم‌چنین در مطالعه‌ای *انتروکوکوس فاسیوم* در pH= ۳ و حضور آنزیم پپسین پایدار بود اما در همین شرایط و در pH= ۲/۵ با کاهش جمعیت روبرو گردید (سائلیم و همکاران ۲۰۱۲). مقاوم‌ترین و حساس‌ترین گونه‌های انتروکوکوس در pH های ۲، ۲/۵ و ۳ خامه تخمیری سنتی مربوط به *انتروکوکوس دورانس*، *انتروکوکوس فکالیس* LDS 6.0934 و KLDS 6.0935 بودند (گیو و همکاران ۲۰۱۵). با توجه به این‌که از ویژگی‌های مهم پروبیوتیک‌ها توانایی زنده‌مانی آن‌ها در شرایط اسیدی معده است، لذا هر چه گونه‌های انتروکوکوس تحمل بیشتری به شرایط اسیدی داشته باشند، گزینه‌های مناسب‌تری برای این منظور هستند. لازم به توضیح است ماتریکس غذایی متشکل از چربی و پروتئین (نظیر آن‌چه که در شیر و محصولات آن وجود دارد) می‌تواند تحمل میکروب‌ها به شرایط نامساعد را افزایش دهد.

در جدول ۲ میزان مقاومت سویه‌های انتروکوکوس نسبت به غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی نشان داده شده است. بر این اساس، غلظت‌های ۰/۱٪ و ۰/۲٪ صفرا اثر معناداری بر کاهش جمعیت جدایه‌ها نداشتند؛ اما در غلظت‌های ۰/۳٪ و به‌ویژه ۰/٤٪ صفرا، جمعیت انتروکوکوس‌ها نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی‌داری

www.SID.ir

Archive of SID

(P<۰/۰۵) نشان داد. با این حال، در پایان ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری تمامی جدایه‌ها با جمعیت قابل‌توجه (۵/٦۹ تا ۷/۸٤ log cfu/ml) بقای خود را حفظ نمودند. مقایسه میزان مقاومت به صفرا در بین گونه‌های مختلف انتروکوکوس و سویه‌های یک گونه در اغلب موارد تفاوت معناداری نشان نداد؛ هر چند بخشی از این اختلاف می‌تواند متأثر از تفاوت در میزان اولیه تلقیح باکتری باشد. در مطالعه مشابهی در مغان و مشگین‌شهر ۲٦ گونه انتروکوکوس قابلیت زنده‌مانی در ۰/۳ درصد از املاح صفراوی را داشتند (جعفری و همکاران ۱۳۹۱). در تحقیق دیگری مشخص گردید که زنده‌مانی همه گونه‌ها با افزایش غلظت نمک‌های صفراوی کاهش می‌یابد (لی و همکاران ۲۰۱۵).

جدول ۲- تغییرات (میانگین±انحراف معیار) جمعیت (log cfu/ml) گونه‌های انتروکوکوس در درصدهای مختلف صفرا

Table 2- Variation in the population (mean±SD) of Enterococcus spp. (log cfu/ml) in different bile concentrations

Enterococcus species	Isolate	Source	Bile concentrations (%)				
			0	0.1	0.2	0.3	0.4
faecium	1	yogurt	8.68± 0.35 ^{bAB}	8.50± 0.47 ^{bAB}	8.07± 0.31 ^{abBC}	7.60± 0.55 ^{abBC}	7.47± 0.49 ^{aBC}
	2	cheese	8.23± 0.25 ^{aAB}	7.71± 0.19 ^{aA}	7.44± 0.41 ^{aAB}	7.49± 0.36 ^{aBC}	7.38± 0.45 ^{aBC}
	3	butter	8.90± 0.18 ^{bAB}	8.23± 0.53 ^{abAB}	8.07± 0.48 ^{abBC}	7.60± 0.57 ^{abBC}	7.30± 0.38 ^{aBC}
	4	Kashk	8.39± 0.21 ^{bAB}	8.25± 0.36 ^{bAB}	7.44± 0.56 ^{abAB}	7.23± 0.49 ^{aBC}	7.07± 0.53 ^{aBC}
	5	cream	8.39± 0.33 ^{cAB}	8.23± 0.40 ^{bcAB}	7.47± 0.37 ^{bcAB}	7.34± 0.41 ^{bBC}	6.30± 0.63 ^{aAB}
	6	raw milk	9.23± 0.33 ^{bAB}	8.79± 0.20 ^{bB}	8.72± 0.19 ^{bC}	8.56± 0.40 ^{bC}	7.47± 0.55 ^{aBC}
faecalis	1	cheese	8.99± 0.28 ^{bAB}	8.78± 0.37 ^{bB}	8.76± 0.43 ^{bC}	8.38± 0.25 ^{bC}	7.30± 0.49 ^{aBC}
	2	butter	8.90± 0.36 ^{bAB}	8.54± 0.31 ^{abAB}	8.31± 0.43 ^{abBC}	8.27± 0.47 ^{abC}	7.61± 0.52 ^{aBC}
	3	buttermilk	9.27± 0.18 ^{bAB}	9.23± 0.22 ^{bB}	9.02± 0.17 ^{bC}	8.17± 0.49 ^{abC}	8.0± 0.53 ^{aC}
	4	cream	8.28± 0.21 ^{bAB}	8.08± 0.37 ^{bAB}	6.77± 0.49 ^{aAB}	6.0± 0.58 ^{aAB}	5.90± 0.66 ^{aAB}
	5	raw milk	9.13± 0.25 ^{bAB}	8.43± 0.36 ^{abAB}	8.38± 0.30 ^{abBC}	8.23± 0.58 ^{abC}	7.77± 0.51 ^{aBC}
gallinarum	1	cream	8.29± 0.33 ^{cAB}	8.18± 0.27 ^{cAB}	7.17± 0.45 ^{bAB}	5.84± 0.68 ^{aA}	5.77± 0.52 ^{aAB}
	2	butter	8.27± 0.19 ^{bA}	8.16± 0.31 ^{bAB}	8.05± 0.25 ^{bBC}	6.95± 0.34 ^{aB}	6.30± 0.41 ^{aAB}
	3	cheese	9.30± 0.29 ^{bB}	8.74± 0.22 ^{bB}	8.56± 0.31 ^{bBC}	8.30± 0.45 ^{abC}	7.47± 0.36 ^{aBC}
	4	raw milk	9.31± 0.30 ^{bB}	9.0± 0.34 ^{bB}	6.47± 0.57 ^{aA}	6.30± 0.64 ^{aAB}	5.69± 0.61 ^{aA}
casseliflavus	1	cream	8.99± 0.25 ^{bAB}	8.11± 0.20 ^{bAB}	8.07± 0.38 ^{bBC}	7.0± 0.55 ^{aBC}	7.17± 0.40 ^{abBC}
	2	raw milk	9.34± 0.34 ^{cB}	8.11± 0.49 ^{bAB}	7.0± 0.56 ^{aAB}	6.30± 0.48 ^{aAB}	6.04± 0.61 ^{aAB}
avium	1	cheese	8.94± 0.30 ^{bAB}	8.39± 0.48 ^{bAB}	8.20± 0.54 ^{bBC}	7.77± 0.28 ^{abBC}	7.0± 0.66 ^{aBC}
	2	cream	8.83± 0.43 ^{bAB}	8.43± 0.35 ^{abAB}	8.14± 0.28 ^{abBC}	7.90± 0.47 ^{abBC}	7.69± 0.51 ^{aBC}
mundtii	1	buttermilk	8.94± 0.42 ^{bAB}	8.49± 0.41 ^{abAB}	8.14± 0.53 ^{abBC}	8.0± 0.56 ^{abC}	7.77± 0.40 ^{aBC}
	2	raw milk	9.31± 0.22 ^{cB}	8.65± 0.46 ^{cAb}	7.47± 0.39 ^{bAB}	6.30± 0.47 ^{aAB}	5.69± 0.61 ^{aA}
hirae	1	raw milk	9.05± 0.30 ^{bAB}	8.38± 0.45 ^{bAB}	7.69± 0.42 ^{abB}	7.25± 0.33 ^{abBC}	6.90± 0.52 ^{aB}
saccharolyticus	1	raw milk	9.31± 0.29 ^{bB}	9.0± 0.45 ^{bB}	6.47± 0.51 ^{abA}	6.30± 0.47 ^{abAB}	5.69± 0.64 ^{aA}
raffinosus	1	raw milk	9.26± 0.19 ^{bAB}	9.02± 0.36 ^{bB}	8.82± 0.41 ^{abC}	8.39± 0.28 ^{abC}	7.84±0.60 ^{aBC}

a, b: Different letters indicate significant (P<0.05) difference among mean values in each raw. A, B, C, D: Different letters indicate significant (P<0.05) difference among mean values in each column.

نتایج ارزیابی قابلیت پروتئولیز جدایه‌های انتروکوکوس نشان داد تمامی جدایه‌ها در ٦ ساعت ابتدایی گرمخانه‌گذاری، فاقد فعالیت پروتئولیتیکی بودند اما با گذشت زمان، قطر هاله پروتئولیز افزایش معناداری (P<۰/۰۵) یافت. به‌علاوه، در موارد متعددی قدرت پروتئولیز در بین گونه‌های مختلف انتروکوکوس و سویه‌های یک گونه تفاوت معناداری (P<۰/۰۵) داشت که با گذشت زمان گرمخانه‌گذاری، این تفاوت مشهودتر می‌شد. بیش‌ترین فعالیت پروتئولیتکی مربوط به گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از دوغ، *ماندتی* جدا شده از شیر خام، *هایرا* جدا شده از شیر خام و *فکالیس* جدا شده از کره بود (جدول ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- میانگین (n=3) قطر هاله پروتئولیز گونه‌های انتروکوکوس در طی زمان گرمخانه‌گذاری

Table 3- Mean value (n=3) of proteolysis diameter produced by *Enterococcus spp.*

Enterococcus species	Isolate	Source	Diameter of proteolysis (mm) during incubation				
			hour			day	
			6	24	48	7	15
faecium	1	yogurt	0 aA	4 bAB	6 cB	8 dB	8 dB
	2	cheese	0 aA	3 bA	6 cB	8 dB	8 dB
	3	butter	0 aA	4 bAB	6 cB	8 dB	8 dB
	4	Kashk	0 aA	3 bA	6 cB	6.6 cAB	7.3 cAB
	5	cream	0 aA	4 bAB	6 cB	8 dB	8 dB
	6	raw milk	0 aA	4.6 bAB	7.3 cBC	7.5 cAB	10.3 dCD
faecalis	1	cheese	0 aA	3 bA	6 cB	7.3 cdAB	8.6 dBC
	2	butter	0 aA	4.6 bAB	7.5 cBC	13 dD	15 eE
	3	buttermilk	0 aA	10 bC	15.3 cE	20 dF	30 eG
	4	cream	0 aA	4 bAB	8 cC	8 cB	8 cB
	5	raw milk	0 aA	4 bAB	6 cB	8 cB	8 cB
gallinarum	1	cream	0 aA	4 bAB	8 cC	8 cB	8 cB
	2	butter	0 aA	4 bAB	8 cC	10 dC	10 dC
	3	cheese	0 aA	4 bAB	6 cB	6 cA	7.5 cAB
	4	raw milk	0 aA	3 bA	4 bA	6 cA	8 dB
casseliflavus	1	cream	0 aA	3.6 bA	6.6 cB	6.6 cAB	6.6 cAB
	2	raw milk	0 aA	5 bB	7 cBC	8 cB	10 dC
avium	1	cheese	0 aA	4 bAB	6 cB	8 cB	8 cB
	2	cream	0 aA	3 bA	5.6 cAB	8 cB	8 cB
mundtii	1	buttermilk	0 aA	4 bAB	6 cB	8 cB	10 eC
	2	raw milk	0 aA	6 bB	8 cC	16 dE	20 eF
hirae	1	raw milk	0 aA	6 bB	8 cC	16 dE	16 dE
saccharolyticus	1	raw milk	0 aA	5 bB	7 cBC	10 dC	11.5 dCD
raffinosus	1	raw milk	0 aA	4 bAB	5 bcAB	6 cA	6 cA

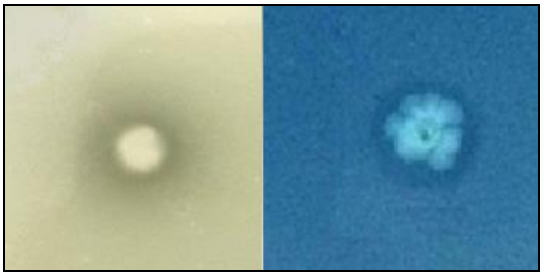
a, b, c, d: Different letters indicate significant (P<0.05) difference among mean values in each raw.
A, B, C, D: Different letters indicate significant (P<0.05) difference among mean values in each column.

داشتن خصوصیات مطلوب تکنولوژیکی از جنبه‌های مثبت پروبیوتیک‌ها به‌حساب می‌آید. به این معنی که علاوه بر پایداری در سیستم گوارشی، چسبیدن به غشای روده و رقابت با باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای، داشتن قابلیت پروتئولیز و لیپولیز که منجر به تولید عطر و طعم در فرآورده‌های تخمیری شیر گردد، می‌تواند از نکات مثبت و برجسته باکتری‌های پروبیوتیکی باشد. حضور انتروکوکوس‌ها و مشارکت آن‌ها در توسعه طعم در انواع پنیر سنتی اثبات شده است (گیرافا ۲۰۰۳). طی مطالعه‌ای در پنیر ایتالیایی تولید شده از شیر بز، بیش‌ترین فعالیت پروتئولیتکی گونه‌های انتروکوکوس مربوط به *انتروکوکوس فکالیس* و کم‌ترین فعالیت پروتئولیتیکی در گونه‌های *دورانس*، *هایرا* و *گالیناروم* بود (سوزی و همکاران ۲۰۰۰). در پژوهش‌های دیگری به خاصیت پروتئولیتیکی انتروکوکوس‌ها پرداخته شده است. مثلاً در پنیر آرزواتهیه شده از شیر گاو، بالاترین فعالیت پروتئولیتیکی مربوط به *انتروکوکوس فکالیس* زیرگونه *لیکوفاسینس* (سنتنو و همکاران ۱۹۹۵) و در پنیر تولوم ترکیه و محصولات لبنی شمال غرب ایتالیا فعالیت پروتئولیتیکی *انتروکوکوس فکالیس* بیشتر از *انتروکوکوس فاسیوم* برآورد گردید (موراندی و همکاران ۲۰۰۶؛ تونجر و همکاران ۲۰۰۹).

توانایی لیپولیز با اندازه‌گیری قطر هاله ایجاد شده در پیرامون کلونی هر جدایه انتروکوکوس ثبت گردید (شکل ۱). یافته‌های آزمون لیپولیز نشان داد گونه‌های مختلف انتروکوکوس و سویه‌های یک گونه، توانایی لیپولیز متفاوتی داشتند که در مواردی این اختلاف به لحاظ آماری معنادار (P<۰/۰۵) بود (جدول ٤).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- هاله لیپولیز (راست) و پروتئولیز (چپ)

Figure 1- Zone of lipolysis (R) and proteolysis (L)

برخی از سویه‌ها از جمله *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از ماست، *گالیناروم* جدا شده از خامه، *هایرا* جدا شده از شیر خام و *رافینوسوس* جدا شده از شیر خام فعالیت لیپولیتیکی از خود نشان ندادند. بالاترین میزان لیپولیز مربوط به گونه‌های *ساکارولیتیکوس* و *کازلیفلاووس* جدا شده از شیر خام و *فکالیس* جدا شده از خامه بود. این یافته‌ها تفاوت‌هایی با آن‌چه که در سایر مطالعات مشاهده شده بود، نشان داد. مثلاً در شیر خام شتر تک‌کوهانه ایرانی *انتروکوکوس فکالیس* (دعوتی و همکاران ۱۳۹۳)، در پنیر تولوم گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس*، *فاسیوم* و *دورانس* (تونجر و همکاران ۲۰۰۹) و در محصولات لبنی شمال غرب ایتالیا *انتروکوکوس فاسیوم* فعال‌ترین گونه از نظر فعالیت لیپولیتیکی بودند (موراندی و همکاران ۲۰۰۶). در مطالعه دیگری در همین راستا، انتروکوکوس‌های جدا شده از پنیر ایتالیایی تهیه شده از شیر بز قادر به هیدرولیز تری‌بوتیرین (به‌عنوان ترکیب لیپیدی محیط کشت) نبودند (سوزی و همکاران ۲۰۰۰). این تفاوت در رفتار لیپولیتیکی انتروکوکوس‌ها می‌تواند در نتیجه تفاوت‌های بین گونه‌ها و سویه‌های یک گونه که از محیط‌های متنوع غذایی و مناطق مختلف جهان جداسازی شده‌اند، باشد.

جدول ۴- میانگین (n=3) قطر هاله لیپولیز تولید شده توسط گونه‌های انتروکوکوس

Table 3- Mean value (n=3) of lipolysis diameter produced by *Enterococcus spp.*

Enterococcus species	Isolate	Source	Diameter of Lipolysis (mm)
faecium	1	yogurt	0 ^{A}
	2	cheese	1 ^{B}
	3	butter	1 ^{B}
	4	Kashk	1 ^{B}
	5	cream	1 ^{B}
	6	raw milk	1 ^{B}
faecalis	1	cheese	1^{B}
	2	butter	1.6 ^{BC}
	3	buttermilk	1 ^{B}
	4	cream	3 ^{D}
	5	raw milk	1 ^{B}
gallinarum	1	cream	0 ^{A}
	2	butter	1.6 ^{BC}
	3	cheese	2 ^{C}
	4	raw milk	1 ^{B}
casseliflavus	1	cream	3 ^{D}
	2	raw milk	2 ^{C}
avium	1	cheese	2 ^{C}
	2	cream	1.33 ^{BC}
mundtii	1	buttermilk	1 ^{B}
	2	raw milk	1.5 ^{BC}
hirae	1	raw milk	0 ^{A}
saccharolyticus	1	raw milk	3.3 ^{D}
raffinosus	1	raw milk	0 ^{A}

A, B, C, D: different letters indicate significant (P<0.05) difference among mean values.

www.SID.ir

Archive of SID

میزان مقاومت و حساسیت سویه‌های انتروکوکوس به ۸ آنتی‌بیوتیک مختلف در جدول ۵ نشان داده شده است. طبق این نتایج، انتروکوکوس‌ها اکثراً به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین حساس و در مقابل، اغلب نسبت به استرپتومایسین، کلرامفنیکل، اریترومایسین، تتراسایکلین و ونکومایسین مقاوم بودند. مشابه رفتار متفاوت سویه‌های انتروکوکوس در آزمون‌های تحمل به اسید و صفرا، در مواجهه با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نیز حساسیت و مقاومت گونه‌های مختلف و سویه‌های یک گونه در مواردی مشابه نبودند.

یافته‌های تحقیق حاضر در مواردی با یافته‌های دیگر مطالعات هم‌راستا و با نتایج برخی دیگر متفاوت بود. برای مثال در مطالعاتی که روی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* انجام گرفت، نسبت به آمپی‌سیلین و پنی‌سیلین حساس بودند (پترز و همکاران ۲۰۰۳؛ والنزوئلا و همکاران ۲۰۰۸) که با یافته‌های مطالعه حاضر مشابهت داشت. اما در بررسی‌های متعدد دیگر گونه‌های انتروکوکوس جدا شده از مواد غذایی مختلف نسبت به ونکومایسین حساس ارزیابی شدند (آریباس و همکاران ۲۰۱۱؛ گرایری و همکاران ۲۰۰۸؛ پترز و همکاران ۲۰۰۳). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت در بخش‌های مختلف جهان موجب حساسیت و مقاومت متفاوت در جدایه‌های هر منطقه شده است. به این معنی که هر چه از یک آنتی‌بیوتیک به‌طور متداول در منطقه‌ای استفاده شود، احتمال ایجاد سویه‌های مقاوم در باکتری‌های آن منطقه افزایش می‌یابد.

جدول ۵- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های انتروکوکوس جدا شده از شیر خام و محصولات لبنی سنتی

Table 5- Antibiotic resistance profile of Enterococcus spp. isolated from raw milk and traditional dairy products

Enterococcus species	Isolate	Source	Antibiotic							
			P	Am	G	ST	C	E	TC	V
faecium	1	yogurt	S	S	R	R	R	R	S	S
	2	cheese	S	S	R	R	R	R	S	S
	3	butter	S	S	R	R	R	R	S	S
	4	Kashk	S	S	R	R	R	R	S	S
	5	cream	R	R	R	R	S	R	I	R
	6	raw milk	S	S	S	R	R	R	R	S
faecalis	1	cheese	S	S	R	R	I	R	R	R
	2	butter	S	S	R	R	R	R	R	R
	3	buttermilk	S	S	R	R	R	R	R	R
	4	cream	S	S	R	R	R	R	R	R
	5	raw milk	S	S	S	R	R	R	R	R
gallinarum	1	cream	S	S	R	R	S	R	R	R
	2	butter	S	S	S	R	R	I	R	R
	3	cheese	R	R	S	R	S	R	R	R
	4	raw milk	S	S	S	R	R	I	R	R
casseliflavus	1	cream	S	S	R	R	I	R	I	R
	2	raw milk	R	R	R	R	R	I	R	R
avium	1	cheese	S	S	R	R	I	R	R	R
	2	cream	R	R	I	R	I	R	R	R
mundtii	1	buttermilk	R	R	R	R	I	R	S	R
	2	raw milk	R	R	I	R	I	S	R	R
hirae	1	raw milk	S	S	R	I	S	I	R	R
saccharolyticus	1	raw milk	S	S	S	I	I	S	R	S
raffinosus	1	raw milk	R	R	R	R	S	R	S	R

P: Penicillin, Am: Ampicillin, G: Gentamicin, ST: Streptomicin, C: Chloramphenicol, E: Erythromycin; TC: Tetracycline, V: Vancomycin; S: Sensitive; R: Resistant; I: Intermediate

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج جستجوی عوامل حدت در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* نشان داد از مجموع ۵ جدایه *انتروکوکوس فکالیس*، ۲ سویه جدا شده از کره و شیر خام، حاوی ژن حدت *Esp* بودند. در مورد گونه *فاسیوم*، ژن حدت *Asa 1* در هیچ یک از ٦ جدایه ردیابی نشد. اغلب سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* با واسطه داشتن ژن‌های حدت متعدد نظیر *esp*، *gelE*، *cylA*، *asa1* و *hyl* برای انسان بیماری‌زا هستند (فرگوسن و همکاران ۲۰۱٦). بر این اساس، در ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی گونه‌های *فکالیس* و *فاسیوم*، ضروری است با استفاده از PCR، نبود ژن‌های حدت (که نمودی از غیربیماری‌زا بودن سویه مزبور هستند) مورد ارزیابی قرار گیرند. در همین راستا مطالعه‌ای بر روی سویه‌های انتروکوکوس جدا شده از محصولات پروبیوتیک انجام گرفته است. طبق یافته‌های این تحقیق، دو سویه *انتروکوکوس فکالیس* واجد ژن حدت *Esp* تشخیص داده شدند، در حالی‌که در سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* ژن حدت *Asa 1* ردیابی نشد (لی و همکاران ۲۰۱۵). مشابه این یافته، در سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* جداسازی شده از محصول تخمیری سویا (یوون و همکاران ۲۰۰۸) و *انتروکوکوس دورانس* جدا شده از کفیر (کاراسی و همکاران ۲۰۱٤)، ژن حدت ردیابی نشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های مطالعه اخیر می‌توان به این جمع‌بندی رسید که شیر خام و فرآورده‌های لبنی سنتی منبع غنی از گونه‌های انتروکوکوس می‌باشند که قابلیت تحمل بالایی به اسید و صفرا دارند. به‌علاوه اکثر جدایه‌های مورد آزمایش واجد خاصیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی هستند و از این نظر می‌توانند در فرایند رسیدن و توسعه عطر و طعم در فرآورده‌های تخمیری سنتی نظیر پنیر مشارکت نمایند. مقاومت انتروکوکوس‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نشان‌دهنده قابلیت بقای این سویه‌ها در روده در صورت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها است. هرچند لازم است این داده‌ها با احتیاط بیشتری تفسیر شوند؛ چرا که مقاومت بیش از حد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مزیت محسوب نمی‌شود و می‌تواند محدودیت‌هایی در انتخاب سویه‌های مزبور به‌دنبال داشته باشد. در نهایت فقدان ژن حدت *Esp* در بیشتر جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و عدم ردیابی ژن حدت *Asa 1* از گونه *فاسیوم* می‌تواند نشانه مثبتی از عدم بیماری‌زا بودن این سویه‌ها باشد؛ با این توضیح که نباید به یک یا چند فاکتور حدت در انتروکوکوس‌ها بسنده نمود و ضروری است تمامی ژن‌های حدت در انترکوکوس‌ها شناسایی و در جدایه‌های این باکتری مورد مطالعه قرار گیرند.

منابع مورد استفاده

جعفری ب، منادی ع ر، رضایی ع، علیزاده س، احمدی‌زاده چ، برزگری ا، پاشازاده م و جعفرزاده ح، ۱۳۹۱. ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی انتروکوکسی جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی منطقه مغان و مشگین‌شهر، مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، ۱، ۱۵۱۳-۱۵۰۵.

دعوتی ن، زیبایی س، طباطبایی یزدی ف، شهیدی ف و عدالتیان م ح، ۱۳۹۳. مطالعه پتانسیل تکنولوژیکی انتروکوکوس‌های جداشده از شیر شتر ایران برای استفاده در صنعت غذا، همایش ملی توسعه پرورش شتر ایران، دانشگاه گنبد کاووس، ۵۲۸- ۵۲۲.

نریمانی ط و تاری‌نژاد ع ر، ۱۳۹۳. جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌های پروبیوتیک از شیر و ماست سنتی گاومیش شهرستان خوی، نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۲٤، ۳، ۳٤۹-۳۳۵.

Arribas P, Sesena S, Poveda JM, Chicon R, Cabezas L and Palop L, 2011. Eenterococcus populations in artisanal manchego cheese: biodiversity and safety aspects. Food Microbiology, 28: 891–899.

www.SID.ir

Archive of SID

Carasi P, Jacquot C, Romanin DE, Elie AM, Antoni GL, Urdaci MC and Serradell M, 2014. Safety and potential beneficial properties of *Enterococcus* strains isolated from kefir. International Dairy Journal, 39: 193–200.

Centeno JA, Cepeda A and Rodríguez-Otero JL, 1995. Identification and preliminary characterization of strains of enterococci and micrococci isolated from Arzúa raw cows'-milk cheese. Molecular Nutrition & Food Research, 39: 55–62.

Domig KJ, Mayer HK and Kneifel W, 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of Enterococcus spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. International Journal of Food Microbiology, 88: 165–188.

Durack J, Kimes NE, Lin DL, Rauch M, McKean M, McCauley K, Panzer AR, Mar JS, Cabana MD and Lynch SV. (2018). Delayed gut microbiota development in high-risk for asthma infants is temporarily modifiable by Lactobacillus supplementation. Nature Communications, 9: 707-712.

Ferguson DM, Talavera GN, Ríos Hernández LA, Weisberg SB, Ambrose RF and Jay JA, 2016. Virulence Genes among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from coastal beaches and human and nonhuman sources in southern California and Puerto Rico. Journal of Pathogens, 1–7.

Garcia-Cano I, Serrano-Maldonado CE, Olvera-Garcia M, Delgado-Arciniega E, Pena-Montes C, Mendoza-Hernandez G and Quirasco M, 2014. Antibacterial activity produced by Enterococcus spp. Isolated from an artisanal Mexican dairy products, Catija cheese. LWT- Food Science and Technology, 59: 26–34.

Ghrairi T, Frere J, Berjeaud JM and Manai M, 2008. Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. Food Control, 19: 162-169.

Giraffa G, 2003. Functionality of enterococci in dairy products. International Journal of Food Microbiology, 88: 215–222.

Guo L, Li T, Tang Y, Yang L and Huo G, 2015. Probiotic properties of Enterococcus strains isolated from traditional naturally fermented cream in China. Microbial Biotechnology, 9(6):737–745.

Gustavo PR, Jeverson F, Alves P and Guades AP, 2009. Antimicrobial resistance profiles of enterococcus spp isolated from food in Southern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 40: 125–128.

Klein G, 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. International Journal of Food Microbiology, 88: 123–131.

Koluman A, Sariye Akan L and Chakiroglu FP, 2009. Occurrence and antimicrobial resistance of Enterococci in retail foods. Food Control, 20: 281–283.

Lei M, Dai X and Liu M, 2015. Biological characteristics and safety examination of five Enterococcal strains from probiotic products. Journal of Food Safety, 35: 324–335.

Martino GP, Espariz M, Gallina Nizo G, Esteban L, Blancato VS and Magni C. 2018. Safety assessment and functional properties of four enterococci strains isolated from regional Argentinean cheese. International Journal of Food Microbiology, 277: 1-9.

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.

Ogier JC and Serror P, 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. International Journal of Food Microbiology, 126: 291–301.

Olvera-García M, Sanchez-Flores A. and Quirasco Baruch M. (2018). Genomic and functional characterisation of two Enterococcus strains isolated from Cotija cheese and their potential role in ripening. Applied Microbiology and Biotechnology, 102: 2251–2267.

Peters J, Mac K, Wichmann-Schauer H, Klein G and Ellerbroek L, 2003. Species distribution and antibiotic resistance patterns of Enterococci isolated from food of animal origin in Germany. International Journal of Food Microbiology, 88: 311–314.

www.SID.ir

Archive of SID

Saelim K, Sohsomboon N, Kaewsuwan S and Maneerat S, 2012. Probiotic properties of *Enterococcus faecium CE5-1* producing a bacteriocin-like substance and its antagonistic effect against antibiotic-resistant enterococci in vitro. Czech Journal of Animal Science, 57: 529–539.

Serio A, Chaves-López C, Paparella A and Suzzi G, 2010. Evaluation of metabolic activities of enterococci isolated from Pecorino Abruzzese cheese. International Dairy Journal, 20: 459–464.

Suzzi G, Caruso M, Gardini F, Lombardi A, Vannini L, Guerzoni ME and Lanorte MT, 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). Journal of Applied Microbiology, 89: 267–274.

Švec P. and Franz CMAP. 2014. The genus Enterococcus. Pp. 175-211. In: Holzapfel WH and Wood BJB (eds). Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy. Wiley Blackwell.

Tuncer Y, 2009. Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish Tulum cheese. African Journal of Biotechnology, 8: 7008–7016.

Valenzuela A, Ben Omar N, Abriouel H, Lopez R, Ortega E, Cañamero M and Galvez A, 2008. Risk factors in Enterococci isolated from foods in Morocco: Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. Food and Chemical Toxicology, 46: 2648–2652.

Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D and Goossens H, 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 hospital isolates of *Enterococcus faecium*. Journal of Clinical Microbiology, 42: 4473–4479.

Wikler MA, Cockeril FR, Craig WA, Dudley MN, Eliopoulos GM, Hecht DW, Hindler JF, Low DE, Sheehan DJ, Tenover FC, Turnidge JD, Weinstein MP and Zimmer BL, 2007. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth Information Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 27: 53–55.

Wohlgemuth S, Loh G and Blaut, M. (2010). Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. International Journal of Medical Microbiology, 300: 3–10.

Yoon MY, Kim YJ and Hwang H, 2008. Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from *Chungkukjang*, a fermented soy product. Lebensmittel Wissenschaft and Technologie, 41: 925–933.

www.SID.ir

Archive of SID

Probiotic potential of Enterococcus species isolated from raw milk and traditional dairy products of Tabriz area

N Piroozpoor[1] and S Hanifian[2*]

Received: August 21, 2017 Accepted: June 18, 2018

[1]MSc Graduated Student, Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[2]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: hanifian@iaut.ac.ir

Introduction: Probiotics are living organisms that, if consumed in the necessary amounts, have health effects on the host's body. The importance of these microorganisms and their health-promoting properties has led to the growth of new useful products including probiotic products (Wohlgemuth et al., 2010). Probiotic bacteria are defined as live microbial dietary supplements that can usefully modify the microbial balance of the host intestine (Durack et al., 2018). Enterococci are commonly found in raw milk and traditional fermented dairy products, and milk is an ideal source for the growth of these organisms (Doming et al. 2003; Švec and Franz 2014). Many species of Enterococcus have proteolytic and lipolytic activity and cause special taste and aroma in traditional cheeses; moreover, some Enterococcus strains have the ability to produce bacteriocin during against pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, as well as Clostridium and Bacillus spp. These characteristics make Enterococci to be considered as a good probiotics candidate; however, they have not yet obtained the status GRAS (Generally Recognized As Safe). Consequently, the presence of Enterococci in dairy products may be hazardous while being useful (Ogier and Serror, 2008). According to previous studies, different species of bacteria have been introduced as probiotics, but most of the introduced probiotics belong to the genus Lactobacillus and Lactococcus. In this regard, some studies have been done on some traditional Iranian dairy products (Narimani and Tarinezhad, 2014) and less attention has been paid to Enterococcus genus, especially native strains isolated from traditional products. The aim of this study was to isolate and identify Enterococci from raw milk and traditional dairy products in Tabriz region and to evaluate their probiotic potential.

Material and methods: Enterococci were isolated by culture method and identified by biochemical tests. For this purpose, 10 g of the sample was mixed with 90 ml of sterile Ringer's solution and placed in a 40 °C water bath for 5 minutes. It was then homogenized by a shaker at 230 rpm for 2 minutes (Koluman et al., 2009). Afterward, 100 µl of the suspensions (and in the case of buttermilk, 100 µl of non-diluted sample) were cultured on Kanamycin Aesculin Azide agar. Cultures were incubated at 42 °C and aerobic conditions for 24-48 hours (Doming et al. 2003). Colonies 1-2 mm in diameter with black halo were selected and cultured on Brain Heart Infusion agar plate (37 °C for 18-24 h) for morphological and screening assays (Garcia-Cano et al., 2014). Since the purpose of the study was to evaluate the probiotic potential of the isolated Enterococcus spp., the species diversity and the source of the isolates (type of dairy product) were considered as the criteria for selection of the strains. Probiotic properties such as acid and bile tolerance, proteolytic and lipolytic activity, susceptibility to antibiotics and virulence factor genes were investigated.

For acid resistance, Enterococcus isolates were cultured in MRS broth (24 h, 37 °C) and then precipitated at 4 °C for 4 min at 4,000 g. 0.1 ml of the precipitate was added to the tubes containing 2 ml of sterile PBS at pHs 1, 2 and 3 (using hydrochloric acid) and mixed. The tubes were then incubated at 37 °C for 120 minutes. Serial dilutions of the samples were prepared and the populations of the survived Enterococcus species were counted at 0, 30, 60 and 120 minutes of incubation using the plate count method. The resistance of the isolates to bile salts was evaluated in broth medium containing 0.1, 0.2, 0.3 or 0.4% bile salts, followed by incubation at 37 °C for 24 h (Lee et al. 2015). For proteolytic and lipolytic activity, the isolates were cultured on Skim milk agar (at 30 °C for 6, 24 and 48 hours and then at 10 °C for 7, 15 days) and Tributyrin agar (for 5 days at 30 °C), respectively (Serio et al. 2010). The antibiotic resistance pattern was conducted by disk diffusion method. The presence of virulence was exploited using PCR assay to detect *Esp* and *Asa1* genes (Wankerwon et al. 2004).

www.SID.ir

Archive of SID

Results and discussion: Various species of Enterococcus were isolated from the tested specimens, among which *E. faecalis* and *E. faecium* were more abundant. Therefore, 24 isolates consisting of 6 isolates of *E. faecium*, 5 isolates of *E. faecalis*, 4 isolates of *E. gallinarum*, 2 isolates of *E. casseliflavus*, 2 isolates of *E. avium*, 2 isolates of *E. mundtii* and 1 isolate from each species of *E. hirae*, *E. saccharolyticus* and *E. raffinosus* were selected for evaluation of probiotic potential. Based on results, none of the Enterococcus species tolerated pH= 1 and 2; however, all of the isolates survived pH= 3 during the 30, 60 and 120 minutes of incubation. Bile tolerance assay revealed that all the species were resistant to 0.1%, 0.2%, 0.3% and 0.4% of bile and their population was reduced along with the increasing of bile concentration. Moreover, various degrees of proteolytic and lipolytic activities were recorded for the different species and also among strains of individual species. The highest proteolytic activity was observed after 15 days in *E. faecalis*, *E. mondetii* and *E. hirae*; meanwhile, the highest lipolysis activity was found for *E. saccharolythicus*, *E. casseliflavus* and *E. faecalis*. In addition, different degrees of sensitivity was observed in the antibiogram assay. *Esp* gene was traced within two *E. faecalis* strains; however, *Asa 1* gene was not observed among *E. faecium* strains.

Conclusion: Based on the findings of the current study, it can be concluded that raw milk and traditional dairy products are a rich source of Enterococcus species that are highly resistant to acid and bile. In addition, most of the isolates tested have proteolytic and lipolytic properties and can, therefore, contribute to the development and development of flavor in traditional fermented products such as cheese. The resistance of Enterococci to different antibiotics indicates the ability of these strains to survive in the gut if antibiotics are used. However, these data need to be interpreted more cautiously, as over-resistance to antibiotics is not an advantage and may have limitations in the selection of these strains. Finally, lack of *Esp* virulence gene in most isolates of *E. faecalis* and lack of *Asa 1* virulence gene in E. *faescium* can be a positive sign of non-pathogenicity of these strains, explaining that one or more virulence factors should not be sufficient in Enterococcus. All virulence genes in Enterococcus are identified and studied in isolates of this bacterium. It can be concluded that *Enterococcus* species could be considered as potential probiotic bacteria, but it is crucial to conduct precise molecular, cellular and animal model investigations in order to assess the safety features of enterococci.

Keywords: *Enterococcus*, Acid tolerance, Bile tolerance, Proteolytic activity, Lipolytic activity, Traditional dairy products

www.SID.ir