مطالعه برخی از خواص تکنولوژیکی جدایه‌های *انتروکوکوس* در پنیر موتال ایرانی

فردین کوهی[1]، حمید میرزایی*[1و2]، یوسف نامی[3]، جلیل خندقی[2و4]، افشین جوادی[1]

۱.گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲.گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳.گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، واحد شمال غرب و غرب پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، تبریز، ایران.

۴.گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران.

***نویسنده مسئول:** *hmirzaei@iaut.ac.ir*

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۶/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۷

چکیده

وجود گونه‌های مختلف *انتروکوکوس* که تأثیر شگرفی در ویژگی‌های تکنولوژیکی پنیر بخصوص عطر و طعم آن دارند، در شیر و فراورده‌های آن به اثبات رسیده است. هدف از انجام این مطالعه بررسی برخی از مهم‌ترین خواص تکنولوژیکی جدایه‌های *انتروکوکوس* دارای خواص پروبیوتیکی از پنیر موتال ایرانی است. برای این منظور، ابتدا میزان رشد جدایه‌های انتروکوکوس در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۳ درجه سلسیوس تعیین و سپس قابلیت اسیدی کردن آن‌ها با اندازه‌گیری pH و نیز مقدار اسیدیته با انکوباسیون در دمای بهینه و در زمان‌های صفر، ۴، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سنجیده شد. در ادامه خواص آنزیمی مرتبط با ویژگی‌های تکنولوژیکی شامل فعالیت پروتئولیتیک و آمیلولیتیک و همچنین تولید دی‌استیل مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد سرعت رشد دو سویه ۳TB و ۷KB متعلق به گونه‌های *E. durans* و *E. faecium*، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بیشتر بوده و سایر جدایه‌ها در دمای ۴۳ درجه سلسیوس بالاترین میزان رشد را داشتند. انتروکوک‌های مورد آزمایش از ساعت ۴ گرمخانه‌گذاری شروع به کاهش معنی دار pH و افزایش اسیدیته نمودند به‌طوریکه به جز دو سویه‌ی 3TB و 7KB بقیه جدایه‌ها توانستند در مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای مناسب رشد، موجب انعقاد شیر شوند. همچنین مشاهده شد که جدایه‌های 5C، 1D و 3B دارای هر سه ویژگی تکنولوژیکی مورد نظر بودند. در مجموع، با توجه به ویژگی‌های تکنولوژیکی مناسب جدایه‌های مورد بررسی به‌خصوص سویه‌های 5C، 1D و 3B می‌توان از آن‌ها به‌عنوان کشت همراه یا الحاقی جهت تولید فرآورده‌های لبنی تخمیری مانند انواع پنیرها استفاده کرد.

کلید واژه‌ها: ویژگی‌های تکنولوژیکی، انتروکوک‌ها، فعالیت پروتئولیتیکی، فعالیت آمیلولیتیکی، تولید دی‌استیل.

مقدمه

انواع گوناگونی از پنیرهای سنتی برای قرون متمادی در ایران تولید شده و روش‌های سنتی جهت آماده‌سازی این محصولات هنوز هم وجود دارد. آنچه سبب بوجود آمدن انواع متفاوت پنیرها شده است روش‌های متنوع تولید آن مانند دلمه کردن، آبگیری و رساندن پنیر می‌باشد (Johnson, 2017). یکی از این پنیرها پنیر موتال است که در فارسی به آن پنیر پوستی نیز اطلاق می‌شود و در شمال‌غرب کشور و بخصوص استان اردبیل و همچنین کشور جمهوری آذربایجان بیشتر تولید می‌شود (Azizi, *et al.*, 2017). این نوع پنیر از شیر خام گوسفند و بز و بدون افزودن آغازگر و در داخل پوست بز یا گوسفند می‌رسد و دارای یک طعم قوی است که احتمالا به خاطر

زمان طولانی تخمیر و فرآوری آن می‌باشد (Najafi, *et al*., 2011). براساس تحقیقات و مطالعات انجام شده، وجود گونه‌های مختلف *انتروکوکوس* در شیر و فراورده‌های آن به اثبات رسیده‌است (Domingos-Lopes, *et al*., 2017). این باکتری‌های لاکتیک تأثیر شگرفی در ویژگی‌های پنیر بخصوص عطر و طعم آن دارند (Piraino, *et al*., 2008). یکی از مهم‌ترین گروه باکتری‌های اسید لاکتیک، انتروکوک‌ها می‌باشند. این باکتری‌ها کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، غیراسپورزا و هموفرمانتاتیو با احتیاجات غذایی پیچیده هستند که پراکندگی گسترده در طبیعت دارند. آن‌ها همچنین قسمتی از فلور میکروبی طبیعی روده انسان و حیوانات را تشکیل می‌دهند و بنابراین بخشی از فلور طبیعی پنیرهای حاصل از شیر خام را نیز شامل می‌شوند (García-Solache and Rice, 2019). یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های باکتری‌های کشت آغازگر کمک به انعقاد شیر می‌باشد که فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌های لاکتیک در کنار تولید اسید توسط این باکتری‌ها به این امر کمک می‌کند (Dewan and Tamang, 2007). همچنین خواص لیپولیتیکی و یا تولید دی استیل موجب ایجاد خصوصیات مطلوب ارگانولپتیک با ایجاد طعم و عطر مطلوب در پنیر می‌شوند (Edalatian Dovom, *et al*., 2010).

ویژگی‌های تکنولوژیکی *انتروکوکوس*‌ها به همراه خواص پروبیوتیکی آن‌ها سبب قرارگیری این باکتری‌های لاکتیک در گروه‌های سودمند میکروارگانیسم‌ها شده است (Nami, *et al*., 2019). در سنوات اخیر در مطالعات مختلف همگام با ویژگی‌های پرووبیوتیکی و بیماری‌زایی برخی از ویژگی تکنولیتیکی جدایه‌های *آنتروکوکوس* از قبیل قدرت تولید اسید در شیر، فعالیت پروتئولیتیکی، کازئینولیتیکی، کاتالازی، آمینوپپتیدازی، آمیلولیتیکی، احیاء نیترات، ، تولید دی‌استیل، اگزوپلی ساکارید، بوتاندیون و استوئین گزارش شده است (Ben Braïek, *et al*., 2018; Domingos-Lopes, *et al*., 2017; Landeta, *et al*., 2013; Nieto-Arribas, *et al*., 2011; Nieto-Arribas, *et al*., 2009). در پژوهش حاضر ویژگی‌های دمای بهینه رشد، قدرت تولید اسید، فعالیت پروتئولیتیکی، فعالیت آمیلولیتیکی و تولید دی‌استیل در شش جدایه *انتروکوکوس* دارای خواص پروبیوتیکی از پنیر موتال ایرانی که در مطالعه قبلی انجام شده توسط نویسندگان و با استفاده از توالی‌یابی ژن 16s rDNA (Kouhi, *et al*., 2022) شناسایی شده بود ، مورد ارزیابی قرار گرفته‌است.

مواد و روش کار

فعال‌سازی جدایه‌های *انتروکوکوس*

سویه‌های جدا شده که قبلا خواص پروبیوتیکی آن تعیین و فقدان فاکتورهای بیماری‌زای مهم آن تایید شده و در محیط کشت MRS broth (Merck, Germany) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شده بود (Kouhi *et al*., 2022)، ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس در محیط کشت MRS agar (Merck, Germany) گرمخانه‌گذاری شد. پس از رشد پرگنه کوچک کرمی رنگ، جدایه‌های فعال شده از نظر شکل میکروسکوپی، رنگ آمیزی گرم و آزمون کاتالاز مورد بررسی و تایید قرار گرفت. سویه‌های فعال شده و کد دسترسی[1]آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- سویه‌های منتخب *انتروکوکوس* جدا شده از پنیر موتال ایرانی

جدایه	گونه	کد دسترسی
5C	*E. faecalis*	MW433828
1D	*E. hirae*	MW433882
9KE	*E. avium*	MW433881
3TB	*E. durans*	MW440541
7KB	*E. faecium*	MW440511
3B	*E. faecalis*	MW433823

بررسی ویژگی‌های تکنولوژیکی

میزان رشد در دماهای مختلف

[1] Accession number

میزان رشد سویه‌های *انتروکوکوس* به روش کدورت‌سنجی و در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۳ درجه سلسیوس تعیین گردید (Smetanková, *et al.*, 2012). برای این منظور ابتدا جدایه‌های منتخب *انتروکوکوس* به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس در محیط MRS broth کشت و گرمخانه‌گذاری شدند و از باکتری‌های فاز سکون برای ادامه آزمون استفاده شد. در ادامه، مقدار ۱۸۰ میکرولیتر از محیط کشت MRS broth به هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه استریل افزوده شد و روی آن ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر یک از جدایه‌های انتروکوک با جذب نوری معادل ۰/۱ (درطول موج ۶۵۰ نانومتر) اضافه گردید. جذب نوری سوسپانسیون میکروبی پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها در طول موج ۶۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (BIOTECK ELx 808, USA) اندازه گیری شد.

قابلیت اسیدیفیکاسیون

برای بررسی قابلیت اسیدیفیکاسیون ابتدا مقدار یک درصد (حجمی-حجمی) از کشت تازه انتروکوک‌ها که جذب معادل نیم مک فارلند دارد در لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از شیر پس چرخ استریل ده درصد تلقیح و به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری شد. قابلیت اسیدی کردن با اندازه‌گیری pH محیط در زمان‌های صفر، ۴، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از دستگاه pHمتر (Metrohm, Switzerland) اندازه‌گیری گردید. اسیدیته‌ی قابل تیتراسیون نیز با تیتراسیون ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون با سود یک نهم نرمال در حضور فنل فتالئین در همان بازه‌های زمانی سنجش و بر حسب درجه‌ی دورنیک گزارش شد (Ayad, *et al.*, 2004).

فعالیت پروتئولیتیک

برای این منظور نیز مقدار 2 میکرولیتر از سوسپانسیون کشت تازه *انتروکوکوس* بر روی سطح Skim milk agar (۲ درصد آگار و ۱۰ درصد شیر پس چرخ) به‌صورت نقطه‌ای تلقیح و ۴ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری صورت گرفت. پس از این مدت، پرگنه‌های دارای هاله روشن در اطراف آن‌ها، به‌عنوان باکتری‌های دارای فعالیت پروتئولیتیکی در نظر گرفته شدند (Franciosi, *et al.*, 2009).

فعالیت آمیلولیتیک

پس از خشک‌شدن سطح محیط کشت Starch agar (HiMedia, India) تهیه‌شده در پلیت‌ها، کشت‌های ۲۴ ساعته جدایه‌های انتروکوک در سطح محیط کشت شده و ۳ تا ۴ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. سپس محلول ید روی سطح محیط کشت اضافه و پس از مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه، ایجاد هاله شفاف زیرین (پس از پاک کردن پرگنه‌های رشدکرده) به‌عنوان فعالیت آمیلولیتیک در نظر گرفته شد (Thapa, *et al.*, 2006).

تولید دی‌استیل

بررسی توانایی تولید دی‌استیل، توسط جدایه‌های انتروکوک به صورت کیفی و مطابق با روش انجام‌شده توسط پرتوی و همکاران (۱۳۹۸) انجام شد. تمام سویه‌ها در محیط MRS براث کشت و سپس به میزان 1 درصد از این باکتری به محیط skim milk منتقل شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس، به 1 میلی‌لیتر از مایع رویی محیط شیر مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر پتاس ۱۶ درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر آلفا نفتول 1 درصد اضافه شد. در پایان تشکیل هاله قرمز رنگ روی سطح محیط مورد ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۳ استفاده شد. فرضیه‌ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (One Way ANOVA) با سطح اطمینان ۰/۰۵ مورد ارزیابی قرار گرفتند و برای مقایسه دو به دوی میانگین‌ها از آزمون آماری توکی در سطح ۰/۰۵ استفاده شد.

یافته‌ها

میزان رشد در دماهای مختلف

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود سرعت رشد و ازدیاد دو سویه 3TB و 7KB که به ترتیب به گونه‌های *E. durans* و *E. faecium* تعلق دارند، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بیشتر است در حالی‌که دیگر جدایه‌ها و همچنین باکتری *انتروکوکوس* کنترل (*E. faecium*, PTCC-1774) در دمای گرمخانه‌گذاری ۴۳ درجه سلسیوس بالاترین میزان رشد و تکثیر را داشته‌اند. بر این اساس در ادامه مطالعه، از دماهای رشد بهینه هر یک از جدایه‌های منتخب برای آزمون‌های دیگر استفاده گردید.

جدول ۲- مقادیر OD_{650} محیط کشت تلقیح شده با جدایه‌های *انتروکوکوس* بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری

جدایه	دمای گرمخانه‌گذاری (سلسیوس)			
	۲۵	۳۰	۳۷	۴۳
5C	۰/۴۳۵	۰/۶۶۷	۱/۱۰۰	۱/۲۱۶
1D	۰/۸۰۰	۱/۱۰۴	۱/۰۷۰	۱/۳۲۹
9KE	۰/۴۲۱	۰/۲۱۴	۰/۵۰۱	۱/۱۸۹
3TB	۰/۵۷۳	۰/۹۳۲	۰/۷۱۳	۰/۷۳۴
7KB	۰/۶۸۵	۰/۸۴۸	۰/۶۳۳	۰/۵۹۰
3B	۰/۳۷۵	۰/۴۵۷	۰/۴۱۷	۱/۳۶۳
PTCC 1778	۰/۳۰۲	۰/۶۳۶	۱/۰۴۵	۱/۱۰۶

قابلیت اسیدیفیکاسیون

همان طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، pH اکثر نمونه‌ها (به‌جز نمونه‌های 5C و 9KE) از ساعت ۴ گرمخانه‌گذاری شروع به کاهش کرده و اختلاف معنی‌داری با مقادیر pH ابتدای دوره نشان می‌دهد ($p<۰/۰۵$). بیشترین کاهش pH در پایان دوره گرمخانه‌گذاری به ترتیب برای سویه‌های 3B ، 9KE و 5C به ثبت رسید. همانگونه که مشاهده می‌شود به جز دو سویه‌ی 3TB و 7KB بقیه جدایه‌ها توانستند در مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای مناسب رشد، موجب انعقاد شیر شوند.

نتایج جدول ۴ نیز نشان می‌هد که هم‌راستا با سرعت کاهش pH ، افزایش عمده در مقادیر اسیدیته نیز از ساعت ۴ گرمخانه‌گذاری شروع شده است و اختلاف معنی‌داری بین اسیدیته نمونه‌های شیر تلقیح‌شده با جدایه‌های انتروکوک در این ساعت با زمان شروع انکوباسیون نمونه‌ها (به‌جز نمونه‌های 3TB و 7KB) وجود دارد ($p<۰/۰۵$). قوی‌ترین جدایه‌ها از نظر افزایش اسیدیته به ترتیب سویه‌های 9KE و 5C می‌باشند و ضعیف‌ترین سویه نیز سویه‌ی 7KB است که پس از ۷۲ساعت اسیدیته شیر را تنها به ۵۲/۵ درجه دورنیک رساند و اختلاف معنی‌داری با سویه شاهد *انتروکوکوس فاسیوم* نشان نداد.

فعالیت پروتئولیتیک، آمیلولیتیک و تولید دی‌استیل

سنجش خواص بیوشیمیایی جدایه‌ها نشان داد که همه آن‌ها فعالیت پروتئولیتیکی داشتند. همچنین فعالیت آمیلولیتیکی سویه‌های منتخب به جز یک مورد (سویه 9KE) و تولید دی‌استیل به جز دو مورد (سویه‌های 3TB و 7KB) در بقیه جدایه‌ها به اثبات رسید (جدول ۵). بنابراین جدایه‌های 5C، 1D و 3B دارای هر سه ویژگی مورد نظر بودند.

جدول ۳- قابلیت اسیدی کردن جدایه‌های *انتروکوکوس* (pH) پنیر موتال ایرانی در دمای ایده‌آل رشد و زمان‌های مختلف

جدایه	دمای بهینه گرمخانه‌گذاری	زمان گرمخانه‌گذاری (ساعت)				
		صفر	۴	۸	۲۴	۴۸	۷۲
5C	۴۳	۶/۶۰±۰/۰۷^{a}	۶/۲۳±۰/۰۱^{a}	۵/۵۴±۰/۰۲^{a}	۴/۵۶±۰/۰۳^{ab}	۴/۵۳±۰/۰۱^{b}	۴/۴۸±۰/۰۴^{bc}
1D	۴۳	۶/۶۰±۰/۰۷^{a}	۶/۲۷±۰/۰۱^{b}	۵/۵۹±۰/۰۱^{a}	۴/۶۴±۰/۰۱^{e}	۴/۵۵±۰/۰۲^{b}	۴/۵۰±۰/۰۳^{c}

9KE	۴۳	۶/۷۱±۰/۰۷^{a}	۶/۲۴±۰/۰۰^{a}	۵/۶۷±۰/۰۱^{ab}	۴/۴۷±۰/۰۶^{ab}	۴/۳۹±۰/۰۵^{a}	۴/۳۴±۰/۰۳^{b}
3TB	۳۰	۶/۶۰±۰/۰۷^{a}	۶/۵۴±۰/۰۱^{e}	۶/۴۴±۰/۰۱^{d}	۵/۶۸±۰/۰۳^{c}	۵/۱۶±۰/۰۶^{c}	۵/۱۴±۰/۰۲^{e}
7KB	۳۰	۶/۵۹±۰/۰۴^{a}	۶/۴۸±۰/۰۱^{d}	۶/۲۴±۰/۰۴^{ca}	۵/۹۸±۰/۰۴^{d}	۵/۵۵±۰/۰۵^{c}	۵/۰۷±۰/۰۱^{e}
3B	۴۳	۶/۶۱±۰/۰۰^{a}	۶/۲۹±۰/۰۱^{b}	۵/۸۲±۰/۰۱^{b}	۴/۴۴±۰/۰۱^{a}	۴/۲۶±۰/۰۸^{a}	۴/۱۷±۰/۰۱^{a}
PTCC 1778	۴۳	۶/۵۹±۰/۰۴^{a}	۶/۴۳±۰/۰۰^{c}	۶/۲۸±۰/۰۱^{cd}	۵/۶۰±۰/۰۸^{c}	۴/۷۶±۰/۰۴^{b}	۴/۶۹±۰/۰۰^{d}

در هر ستون تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف متفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$)

جدول ۴- قابلیت اسیدی کردن جدایه‌های *انتروکوکوس* (اسیدیته) پنیر موتال ایرانی در دمای ایده‌آل رشد و زمان‌های مختلف

جدایه	دمای بهینه گرمخانه‌گذاری	زمان گرمخانه‌گذاری (ساعت)					
		صفر	۴	۸	۲۴	۴۸	۷۲
5C	۴۳	۱۵/۱±۰/۱^{a}	۱۹/۵±۰/۱^{b}	۴۲/۰±۰/۳^{d}	۱۰۰/۰±۲/۵^{e}	۱۰۳/۰±۲/۱^{bc}	۱۰۵/۰±۰/۸^{d}
1D	۴۳	۱۴/۵±۰/۷^{a}	۲۰/۵±۰/۷^{b}	۳۹/۵±۲/۱^{d}	۸۲/۵±۳/۵^{c}	۹۳/۵±۲/۱^{b}	۹۵/۵±۰/۷^{c}
9KE	۴۳	۱۴/۳±۰/۴^{a}	۱۹/۵±۰/۷^{b}	۳۲/۵±۰/۷^{c}	۱۰۰/۰±۳/۰^{e}	۱۱۲/۵±۳/۵^{c}	۱۱۳/۵±۰/۱^{e}
3TB	۳۰	۱۵/۰±۰/۰^{a}	۱۵/۳±۰/۴^{a}	۲۱/۵±۰/۷^{a}	۴۷/۵±۳/۵^{b}	۶۰/۰±۷/۱^{a}	۷۱/۰±۰/۴^{b}
7KB	۳۰	۱۴/۳±۰/۴^{a}	۱۵/۹±۰/۱^{a}	۲۴/۰±۱/۴^{ab}	۳۲/۵±۳/۵^{a}	۴۷/۵±۳/۵^{a}	۵۲/۵±۰/۵^{a}
3B	۴۳	۱۴/۵±۰/۷^{a}	۲۰/۳±۰/۴^{b}	۳۲/۵±۰/۷^{c}	۹۲/۵±۳/۵^{cd}	۹۷/۵±۴/۵^{bc}	۹۵/۰±۰/۰^{c}
PTCC 1778	۴۳	۱۴/۵±۰/۷^{a}	۱۵/۳±۰/۳^{a}	۲۷/۵±۰/۷^{b}	۴۳/۵±۲/۱^{ab}	۴۷/۵±۳/۵^{a}	۵۰/۰±۰/۰^{a}

در هر ستون تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف متفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$)

جدول ۵- برخی از ویژگی‌های تکنولوژیکی جدایه‌های *انتروکوکوس* پنیر موتال ایرانی

جدایه	ویژگی تکنولوژیکی		
	فعالیت آمیلولیتیکی	فعالیت پروتئولیتیکی	تولید دی‌استیل
5C	+	+	+
1D	+	+	+
9KE	-	+	+
3TB	+	+	-
7KB	+	+	-
3B	+	+	+
PTCC 1778	+	-	+

بحث

با توجه به اینکه فعالیت‌های متابولیکی باکتری‌ها وابسته به رشد و تزاید تعداد آن‌ها است، در این مطالعه ابتدا سرعت رشد و تزاید انتروکوک‌ها در دماهای مختلف سنجیده شد که نتایج نشان داد جدایه‌های 5C، 1D و 9KE ، به ترتیب متعلق به گونه‌های *E. faecalis*، *E. hirae* و *E. avium* همانند سویه شاهد *E. faecium* در دمای ۴۳ درجه سلسیوس رشد بالاتری داشتند. مقاومت انتروکوک‌ها به دمای بالا در تعدادی از مطالعات به اثبات رسیده و بیان شده است که استفاده از این جدایه‌ها در تهیه پنیرهایی که مرحله پخت را می‌گذراند نیز ممکن است (Franciosi, *et al.*, 2009).

میزان تولید اسـید را شاید بتوان اصلی‌ترین ویژگی تکنولوژیکی یک باکتری در محصولات لبنی تخمیری نامید، چرا که هم در ایجاد عطر و طعم فرآورده نقش داشته و هم با کاهش pH مانع رشد باکتری‌های مزاحم و عامل فساد یا بیماری‌زا در فراورده می‌شود (Izadimehr, *et al.*, 2018). در مطالعات مختلفی تولید اسید توسط باکتری‌های انتروکوک پس از ۶ ساعت

(Sarantinopoulos, et al., 2001) و یا ۸ ساعت گزارش شده‌است در حالی‌که در تحقیق حاضر پس از ساعت 4 گرمخانه‌گذاری، اختلاف معنی‌داری بین اکثر جدایه‌های *انتروکوکوس* مورد مطالعه از نظر کاهش pH مشاهده شد. در مطالعات انجام گرفته در مورد خاصیت اسیدیفیکاسیون باکتری‌های *انتروکوکوس* جدا شده از محصولات لبنی، گزارشاتی مبنی بر تولید اسید ضعیف توسط این جدایه‌ها (Abeijón, *et al*., 2006; Perin, *et al*., 2017) و برعکس شواهدی دال بر خاصیت قوی کاهش pH (همانند نتایج مطالعه حاضر) وجود دارد (Piraino, *et al*., 2008). در یک طبقه‌بندی باکتری‌های لاکتیک بر اساس میزان کاهش pH در مدت زمان ۲۴ ساعت، به 3 گروه با ظرفیت اسیدی بالا (کاهش بیش از ۲ واحد)، متوسط (کاهش ۱/۵ تا ۲ واحد) و پایین (کمتر از ۱/۵ واحد) تقسیم بندی شده‌اند (Nieto-Arribas, *et al*., 2009) که بر این اساس جدایه‌های 5C، 9KE و 3B سویه‌های با قدرت بالای تولید اسید، جدایه 1D سویه با قدرت متوسط و بقیه جدایه‌ها سویه‌های ضعیف از نظر تولید اسید بودند. فعالیت پروتئولیتیک هم می‌تواند به دلیل تجزیه کازئین در ایجاد بافت و طعم مطلوب در پنیر نقش داشته باشد و هم می‌تواند در کنار رنین یک نقش کمکی در رسیدن پنیر و بافت آن ایفا کند (Franz, *et al*., 2011; Graham, *et al*., 2020). در همین ارتباط، نشان داده شده است که افزودن *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از پنیر در مراحل تولید پنیر فتا، موجب بهبود رشد باکتری‌های اسید لاکتیک دیگر شده و اثرات مطلوبی بر طعم، بو و بافت پنیر فتا داشته است (Sarantinopoulos, *et al*., 2002). از طرفی برخی از پپتیدهای حاصل از تخریب پروتئین‌ها طعم تلخ داشته و اثر نامطلوب بر طعم پنیر می‌گذارند (Abeijón, *et al*., 2006). پژوهشگران معتقدند که فعالیت‌های آنزیمی از جمله تولید آنزیم‌های پروتئولیتیک در سویه‌های مختلف *انتروکوکوس* جدا شده از منابع مختلف با یکدیگر متفاوت است (Worsztynowicz, *et al*., 2019) و این مسئله اهمیت مطالعات بر روی جدایه‌های محصولات بومی سنتی را نشان می‌دهد. در مطالعه ما همه جدایه‌های *انتروکوکوس* پنیر موتال قادر به تولید آنزیم‌های پروتئولیتیک بودند که متعلق به کونه‌های متنوع یعنی *E. faecalis*، *E. hirae*، *E. avium*، *E. durans* و *E. faecium* بودند. آسپری و همکاران (۲۰۱۶) نیز مشاهده کردند، که اکثریت انتروکوک‌های مورد بررسی (۷۸درصد)، قادر به فعالیت پروتئولیتیکی بودند (Aspri, *et al*., 2017) در حالی‌که برخی دیگر از دانشمندان میزان فعالیت‌های پروتئولیتیک در *انتروکوکوس*‌ها را پایین و محدود به *E. durans* (Franciosi, *et al*., 2009) دانسته‌اند.

ثابت شده‌است که انتروکوک‌ها پتانسیل متابولیکی تجزیه سیترات و پیرووات و تبدیل آن به ترکیبات فرار طعم دهنده‌ای مانند دی‌استیل و استوئین را دارند (Perin, *et al*., 2017) و این موضوع اهمیت آن‌ها را در توسعه خواص ارگانولپتیکی محصولات لبنی تخمیر شده تأیید می‌کند. این مسئله در یافته‌های محققین دیگر نیز در مورد *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس دیورانس* گزارش شده‌است (Abeijón, *et al*., 2006; Sarantinopoulos, *et al*., 2001). در بررسی ما جدایه‌های متعلق به گونه‌های *E. faecalis*، *E. hirae* و *E. avium* قادر به تولید دی‌استیل بودند.

نتایج این مطالعه نشان داد که تمامی جدایه‌ها به‌جز یک مورد توانایی تولید آمیلاز داشتند. گرچه تا کنون گزارشی مبنی بر استفاده از باکتری‌های لاکتیک آغازگر در فراورده‌های لبنی وجود ندارد ولی از انتروکوک‌های تولید کننده آمیلاز در ماهی تخمیری سنتی در مناطق هیمالیا (Thapa, *et al*., 2006) استفاده شده است. همچنین حضور انتروکوک‌های دارای فعالیت آمیلولیتیکی در شیر انسان (Bhagwat and Annapure, 2019) گزارش شده است.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که سویه‌های *انتروکوکوس* جدا شده از پنیر سنتی موتال از فعالیت

اسیدیفیکاسیون خوبی برخوردار بوده و همچنین قابلیت پروتئولیز و تولید دی‌استیل داشتند. به نظر می‌رسد این جدایه‌ها می‌توانند در ایجاد طعم پنیر نقش موثری داشته باشند. بنابراین، با توجه به ویژگی‌های تکنولوژیکی مناسب جدایه‌های مورد بررسی به‌خصوص سویه‌های 5C، 1D و 3B می‌توان از آن‌ها به‌عنوان کشت همراه یا الحاقی جهت تولید فرآورده‌های لبنی تخمیری مانند انواع پنیرها استفاده کرده و از خواص سودمند پروبیوتیکی این باکتری‌ها بهره‌مند شد.

منابع

1. 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. Can. J. Microbiol. 52(3):237-245 .
2. Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill, C. and Papademas, P. 2017. Raw donkey milk as a source of Enterococcus diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. Food Control, 73:81-90 .
3. Ayad E., Nashat S., El-Sadek N., Metwaly H. and El-Soda M. 2004. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. Food Microbiol. 21(6):715-725 .
4. Azizi F., Habibi Najafi M.B. and Edalatian Dovom M.R. 2017. The biodiversity of Lactobacillus spp. from Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation based on bacteriocin-encoding genes. Amb Express, *7*(1):1-10.
5. Ben Braïek O., Stefano M., Paola C., Slim S., Khaled H. and Taoufik G. 2018. Safety, potential biotechnological and probiotic properties of bacteriocinogenic enterococcus lactis strains Isolated from raw shrimps. Microb. Pathog. 117:109–17.
6. Bhagwat A. and Annapure U.S. 2019. In vitro assessment of metabolic profile of Enterococcus strains of human origin. J. Genet. Eng. Biotechnol. 17(1):1-11 .
7. 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 .
8. Domingos-Lopes M., Stanton C., Ross P., Dapkevicius M. and Silva C. 2017. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. Food Microbiol. 63:178-190.
9. Edalatian Dovom M.R., Habibi Najafi M.B., Mortazavi S.A., Nassiri M., Bassami M.R. and Hashemi, M. 2010. Isolation and Identification the indigenous Lactic Flora from Lighvan, as an Irania Raw Milk Cheese from Milk and Ripend Cheese. International Conference on Nutrition and Food Sciences.
10. Franciosi E., Settanni L., Cavazza A. and Poznanski E. 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. Int. Dairy J. 19(1):3-11 .
11. Franz C.M., Huch M., Abriouel H., Holzapfel W. and Gálvez A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. Int. J. Food Microbiol. 151(2):125-140 .
12. García-Solache M. and Rice L.B. 2019. The Enterococcus: a model of adaptability to its environment. Clin. Microbiol. Rev. 32(2), e00058-18.
13. Graham K., Stack H. and Rea R. 2020. Safety, beneficial and technological properties of enterococci for use in functional food applications–a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 60(22):3836-3861 .
14. Izadimehr Z., Yavarmanesh M., Habibi M.B., Edalatian Dovom M.R. 2018. Technological and antimicrobial characteristics of nonpathogenic strains *Enterococcus faecium* subsp. *faecium* isolated from traditional cheese. Journal of Food Science & Technology. 81(15):479-491. [In Persian].

15. Johnson M. 2017. A 100-Year Review: Cheese production and quality. J. Dairy Sci. 100(12):9952-9965 .
16. Kouhi F., Mirzaei H., Nami Y., Khandaghi J. and Javadi A. 2022. Potential probiotic and safety characterisation of Enterococcus bacteria isolated from indigenous fermented Motal cheese. Int. Dairy J. 126, 105247 .
17. Landeta G., Curiel J.A., Carrascosa A.V., Muñoz R. and De las Rivas B. 2013. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. Meat Sci. 95(2):272–80.
18. Najafi A., Ziabakhsh Deylami M., Karimian H. Abedinia A. and Hosseini Nejad M. 2011. Microbiological Changes of Pousti Cheese During Ripening. Journal of Food Technology and Nutrition, 8(2):85-92. [In Persian]
19. Nami Y., Vaseghi Bakhshayesh R., Mohammadzadeh Jalaly H., Lotfi H., Eslami S. and Hejazi M.A. 2019. Probiotic properties of Enterococcus isolated from artisanal dairy products. Front. Microbiol. 10, 300.
20. Nieto-Arribas P., Seseña S., Poveda J., Palop L. and Cabezas L. 2009. Genotypic and technological characterization of Lactococcus lactis isolates involved in processing of artisanal Manchego cheese. J. Appl. Microbiol. 107(5):1505-1517 .
21. Nieto-Arribas P., Susana S., Justa M.P., Rosa C., Lourdes C. and Lianos P. 2011. Enterococcus populations in artisanal Manchego cheese: biodiversity, technological and safety Aspects. Food Microbiol. 28(5):891–99.
22. Partovi R., Alian Samakkhah S. and Kazemeini H. 2019. Characterization of technological properties of E. faecium and E. durans strains isolated from Siahmazgi traditional cheese. Iranian Veterinary Journal. 15(63):27-37. [In Persian]
23. Perin L.M., Belviso S., Bello B., 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. J. Food Prot. 80(1):151-157.
24. 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. J. Food Prot. 80(1), 151-157.
25. Piraino P., Zotta T., Ricciardi A., McSweeney P.L. and Parente E. 2008. Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study. Int. Dairy J. 18(1):81-92 .
26. 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. Int. Dairy J. 11(8):621-647 .
27. Sarantinopoulos P., Kalantzopoulos G. and Tsakalidou E. 2002. Effect of Enterococcus faecium on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. Int. J. Food Microbiol. 76(1-2):93-105 .
28. Smetanková J., Hladíková Z., Valach F., Zimanová M., Kohajdová Z., Greif G. and Greifová M. 2012. Influence of aerobic and anaerobic conditions on the growth and metabolism of selected strains of Lactobacillus plantarum. Acta Chim. Slov. 5(2):204.
29. Thapa N., Pal J. and Tamang J.P. 2006. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. Int. J. Food Microbiol. 107(1):33-۳۸.
30. Worsztynowicz P., Schmidt A.O., Białas W. and Grajek W. 2019. Identification and partial characterization of proteolytic activity of Enterococcus faecalis relevant to their application in dairy industry. Acta Biochim. Pol. 66(1), 61-69.

Investigation of some technological properties of *Enterococcus* isolates in Iranian Motal cheese

Kouhi F[1], Mirzaei H[1,2*], Nami Y[3], Khandaghi J[2,4], Javadi A

1. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2. Department of food Biotechnology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3. Department of Food Biotechnology, Branch for Northwest & West region, Agricultural Biotechnology Research, Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran.
4. Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.

***Corresponding author:** *hmirzaei@iaut.ac.ir*

Received: 20 September 2022 Accepted: 28 November 2022

Abstract

The existence of different species of *Enterococcus*, which have a significant effect on the technological characteristics of cheese, particularly its flavor, has been established in milk and dairy products. This study aimed to explore some of the most significant technological features of Iranian Motal cheese-derived *Enterococcus* isolates with probiotic characteristics. For this, first the growth rates of *Enterococcus* isolates at 25, 30, 37, and 43 °C were measured, and their ability for acidification was then assessed by measuring pH and acidity by incubation at the optimal temperature for zero, 4, 8, 24, 48 and 72 hours. Subsequently, enzymatic aspects related to technological features including proteolytic and amylolytic activity as well as diacetyl production were evaluated. The results showed that the growth rates of 3TB and 7KB strains belonging to *E. durans* and *E. faecium* were greater at 30 °C and that other isolates had the maximum growth rates at 43 °C. Beginning with the fourth hour of incubation, the examined enterococci significantly decreased pH and increased acidity so that, all of the isolates were able to coagulate milk within 72 hours of incubation at the proper growth temperature, with the exception of the 3TB and 7KB strains. It was also observed that isolates 5C, 1D and 3B had all three desired technological characteristics. Overall, examined isolates, particularly the 5C, 1D, and 3B strains, can be employed as an adjunct culture for the manufacture of fermented dairy products such as various cheese types due to their appropriate technological properties.

Keywords: Technological features, *Enterococci*, Proteolytic activity, Amylolytic activity, Diacetyl production.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited Copyright © 2023 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.