

جداسازی و شناسایی سویه های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم از پنیر سنتی ليقوان

رسولی پیروزیان، هانیه*^۱ - حصاری، جواد^۲ - فرج نیا، صفر**^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی - دانشکده کشاورزی - دانشگاه تبریز. ۳۸۵۳۹۷۲-۰۴۱۱). rasuly_h@yahoo.com

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی - دانشکده کشاورزی - دانشگاه تبریز. ۳۳۹۲۰۳۲-۰۴۱۱). Jhesari@tbz.ac.ir

۳- استادیار مرکز تحقیقات کاربردی-دارویی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژیکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۳۳۶۳۲۳۴-۰۴۱۱).

farajnia@tbzmed.ac.ir

چکیده

در تحقیق جاری، سویه های انتروکوکوس از پنیر سنتی ليقوان جداسازی شده و اثر آن در بهبود عطر و طعم پنیر سفید UF از طریق استفاده بعنوان کمک استارتر مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ۴ نمونه پنیر سنتی ليقوان از ۴ کارگاه مختلف در منطقه ليقوان خریداری شد. با استفاده از محیط کشت اختصاصی، سویه ها جداسازی و با استفاده از روشهای استاندارد میکروبیولوژیکی شناسایی گردیدند. برای شناسایی گونه ها از تست تخمیر قند استفاده گردید. برای شناسایی گونه ها از تست تخمیر قند و شش نوع قند رافینوز، سوربیتول، آرابینوز، لاکتوز، ملی بیوز و سوربوز استفاده گردید. نتیجه این تحقیق نشان داد که سویه های غالب در این چهار نوع پنیر خریداری شده از ليقوان، انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم بودند. طوریکه در نمونه پنیر اول انتروکوکوس فکالیس، در پنیر چهارم انتروکوکوس فاسیوم سویه های غالب بوده و در پنیر دوم از پنج سویه، چهار سویه انتروکوکوس فاسیوم و در پنیر سوم چهار سویه انتروکوکوس فکالیس بودند. کلمات کلیدی: انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فاسیوم، پنیر ليقوان، پنیر سنتی، محیط کشت اختصاصی.

۱- مقدمه

باکتری های جنس انتروکوکوس، ارگانسیم هایی گرم مثبت، کاتالاز منفی، تخم مرغی شکل و غیر اسپورزا، بی هوازی اختیاری، هموفرماتاتیو با احتیاجات غذایی پیچیده هستند (هایوکی، ۱۹۹۸) که اغلب در اکثر سبزیجات، گیاهان و مواد غذایی مخصوصا غذاهای با منشاء حیوانی مانند محصولات لبنی حضور دارند. آنها هم چنین قسمتی از فلور میکروبی طبیعی روده بعضی از پستانداران و انسان را تشکیل می دهند (گیرافا، ۲۰۰۳). تعداد قابل توجهی از سویه های متعلق به گونه های متفاوت جنس انتروکوکوس دارای خواص بیولوژیکی یکسان مانند تولید باکتریوسین و رفتارهای پروبیوتیکی هستند. چنین باکتری هایی قادرند که به صورت کلونی های تورفته از بقیه متمایز شوند و مقاومت استثنایی این باکتریها باعث توانایی رشد آنها در محیط خارج روده ای می گردد. از این رو در خاک، آب های سطحی، روی گیاهان و سبزیجات هم مشاهده شده (گیرافا، ۲۰۰۲) و می توانند در محیط های هیپو تونیک، هایپر تونیک، اسیدی و قلیایی رشد کنند (هایوکی، ۱۹۹۸). دوام انتروکوکوس در طی رسیدن پنیر می تواند به محدوده وسیع رشد دمایی ۴۵-۱۰°C، اسید (۹/۶-۴ pH) و تحمل نمک (با غلظت ۵/۶ درصد NaCl) نسبت داده می شود (اوگیر و همکاران، ۲۰۰۷).

انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس دورانس گونه هایی هستند که بیشترین فراوانی را در بین سایر گونه ها به خود اختصاص داده و به طور فراوان در محصولات لبنی یافت می شوند. بنابراین آنها می توانند نقش بسیار مهم در بافت و آرومای پنیر ایفا کنند (مورانندی و همکاران، ۲۰۰۶). انتروکوکوسی به عنوان بخش مهمی از میکرو

فلور طبیعی بسیاری از فرآورده های لبنی تشخیص داده شده و در بعضی از پنیرها، آنها بر فلور لاکتوباسیل و لاکتوکوکسی غالب هستند (سوزی و همکاران، ۲۰۰۰).

انتروکوکوس کاربردهای مهمی در صنعت لبنیات دارد و در تکوین خصوصیات ارگانولپتیکی در طی رسیدن بسیاری از پنیرها نقش ایفا می کنند. هم چنین از آن به عنوان مولفه اصلی در محیط کشت استارتر استفاده می شود (گیرافا، ۲۰۰۲). برای تأیید این مساله، بسیاری از محققان ادعا نموده اند که انتروکوکوس می تواند دارای فعالیت های پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی باشد و بنابراین می تواند نقش بسیار مهمی در رسیدن پنیر ایفا کند (نقل از مورنو، ۲۰۰۶). سویه های انتروکوکوس فکالیس فعالیت لیپولیتیکی و پروتئولیتیکی بیشتری نسبت به سایر سویه ها دارند. این میکروارگانیسم ها در مواد غذایی در طی نگهداری، تولید مواد آنتی میکروبیال (اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک و اسید استیک، اتانول، دی اکسید کربن، دی استیل) می کنند که مورد استفاده قرار می گیرند (مورنو، ۲۰۰۶).

سویه ای از انتروکوکوس به نام *E. faecium SF68* به عنوان پروبایوتیک در سوئیس استفاده شده که اثر کلینیکی موثری در جلوگیری از اسهال دارد و در فرآیند درمان اسهال در کودکان موثر شناخته شده است. اخیراً کمیته نظارت بر مواد غذایی در انگلیس^۱ استفاده از سویه *E. faecium K77D* را به عنوان استارتر محصولات لبنی تخمیری تأیید نموده است (نقل از مورنو، ۲۰۰۶).

باکتریهای اسید لاکتیک توانایی تجزیه ترکیبات شیر به ترکیبات فرار و معطر را دارند و به همین منظور می توانند نقش مهمی در تکوین طعم و آرومای پنیر دارند (سونی و همکاران، ۲۰۰۳). تجزیه لاکتوز و سیترات طی رسیدگی پنیر باعث تولید ترکیبات فرار مانند استالدئید، اتانول، دی استیل، استون و استوئین می شود که منجر به تکوین آروما می گردد. ترکیب فرار عمده تولید شده در شیر توسط سویه های انتروکوکوس فکالیس، فاسیوم و دورانس، استالدئید، اتانول و استوئین است. سویه های انتروکوکوس فکالیس و به مقدار کمتر انتروکوکوس فاسیوم، بیشترین مقدار این ترکیبات را تولید می کنند که اکثر آنها دارای منشا غذایی هستند.

حضور انتروکوکوس در مقادیر بالا در پنیرهای مختلف و اثر آنها در کمک به بهبود ویژگی های ارگانولپتیکی مواد غذایی تخمیری و توانایی آنها در تولید باکتریوسین ها (انتروسین) خصوصیات مهمی هستند که باعث کاربرد آنها در تهیه مواد غذایی توسط فرآوری کننده ها می گردد.

با استناد به مطالب ارائه شده و با توجه به اینکه در ایران نیز پتانسیل های خوبی برای تولید و فرآوری محصولات لبنی وجود دارد و با توجه به ذائقه خاص مردم ایران، زمینه های لازم برای بررسی و تحقیق بر روی سویه های بومی موجود در محصولات سنتی کاملاً احساس می گردد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- تهیه پنیر سنتی ليقوان

در مرحله اول ۴ نمونه پنیر سنتی ليقوان از ۴ منطقه و کارگاه مختلف از روستای ليقوان واقع در جنوب شرقی استان آذربایجان شرقی خریداری شد.

۲-۲- جداسازی و شناسایی باکتری های انتروکوکوس

^۱ 'Advisory Committee On Novel Foods and Processes' (ACNFP)

روش شناسایی در این تحقیق مبتنی بر روشهای فنوتیپی بود. روش کلی جداسازی و شناسایی باکتریهای انتروکوکوس به ترتیب زیر عملی گردید:

با استفاده از روش های بیوشیمیایی، سوش های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم جداسازی و تعیین هویت شدند.

برای جداسازی باکتری های انتروکوکوس از محیط کشت اختصاصی کانامایسین اسکولین آزید آگار به عنوان مناسب ترین محیط کشت برای شناسایی در نظر گرفته شد. در این محیط وجود کانامایسین به عنوان عامل انتخابی است. انتروکوک ها با هیدرولیز اسکولین تولید گلوکز و اسکولتین می کنند که در حضور سترات فریک رنگ قهوه ای ایجاد می شود. برای جداسازی انتروکوکها ۵ گرم از پنیر مورد نظر توزین و سپس با ۱۰ میلی لیتر بافر PBS مخلوط شده و به مدت چند دقیقه مخلوط و یکنواخت گردید. سپس بقیه رقتها از محلول همگن حاصل در اپندورف های حاوی ۹۰۰ میکرولیتر ۰٫۱ PBS درصد استریل تهیه شد. رقتهای 10^{-1} ، 10^{-2} و 10^{-3} در بافر PBS تهیه گردیدند. مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از هر رقت در یک پلیت کانامایسین اسکولین آگار پخش گردید. به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. کلونی های رشد یافته در هر پلیت پس از سپری شدن مدت انکوباسیون مورد شمارش قرار گرفتند. سپس ۵ کلونی بصورت تصادفی از پلیت هایی که به طور متوسط ۱۰۰-۳۰ کلونی در آنها شمارش شده بود، برداشته شده و مجددا روی همان محیط کشت اختصاصی کانامایسین، کشت سطحی داده شدند (سوزی و همکاران، ۲۰۰۰).

۳-۲- واکنش تخمیر قندها

برای شناسایی گونه های انتروکوکوس، واکنش تخمیر قندها برای تمامی جنس های جداسازی شده انجام گرفت. محیط کشت پایه مورد استفاده شامل LB براث فاقد گلوکز و عصاره مخمر بود که به آن ۰٫۰۱ درصد کروزل قرمز به عنوان شاخص تغییر pH افزوده شد. محلول ۱ درصد از قندهای مورد نظر در محیط کشت مذکور تهیه شد. سپس پارافین افزوده شد تا تخمیر در شرایط کاملاً بی هوازی صورت گیرد (لوپز و همکاران، ۲۰۰۰).

نتایج

واکنش تخمیر قندها

به طور کلی برای شناسایی گونه های انتروکوکسی، تست مقاومت و تخمیر قند پیشنهاد شده است. از طرف دیگر گزارش شده است که استفاده از تیروزین دکربوکسیلاز، یک تست مناسب برای تشخیص انتروکوکسی از استرپتوکوکسی می باشد. اما به علت حلالیت کم تیروزین برای آزمایشات روتین مناسب نمی باشد (لی، ۱۹۷۲). شناسایی گونه های ویژه از جنس استرپتوکوکوس و انتروکوکوس توسط تست های فنوتیپیک سنتی در بسیاری از موارد امکان پذیر می باشد، هرچند در بین برخی گونه های یک گروه جواب نمی دهد (هاردی و همکاران، ۱۹۹۷).

جدول ۱- نتیجه تست تخمیر قند برای پنیر ۱

	لاکتوز	سوربیتول	سوربوز	رافینوز	ملی بیوز	آرابینوز
سویه ۱ <i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	+
سویه ۲ <i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	-
سویه ۳	+	+	-	-	-	+

<i>E. faecalis</i>						
سویه ۴ <i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	+
سویه ۵ <i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	+

جدول ۲- نتیجه تست تخمیر قند برای پنیر ۲

	لاکتوز	سوربیتول	سوربوز	رافینوز	ملی بیوز	آرابینوز
سویه ۱ <i>E. faecium</i>	+	-	-	-	-	-
سویه ۲ <i>E. faecium</i>	+	-	-	-	-	+
سویه ۳ <i>E. faecium</i>	+	-	-	-	-	+
سویه ۴ <i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	-
سویه ۵ <i>E. faecium</i>	+	-	-	-	-	+

جدول ۳- نتیجه تست تخمیر قند برای پنیر ۳

	لاکتوز	سوربیتول	سوربوز	رافینوز	ملی بیوز	آرابینوز
سویه ۱ <i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	-
سویه ۲ <i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	+
سویه ۳ <i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	+
سویه ۴ <i>E. faecium</i>	+	+	-	-	-	-
سویه ۵ <i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	-

جدول ۴- نتیجه تست تخمیر قند برای پنیر ۴

	لاکتوز	سوربیتول	سوربوز	رافینوز	ملی بیوز	آرابینوز
سویه ۱ <i>E. faecium</i>	+	-	-	-	-	-
سویه ۲ <i>E. faecium</i>	+	-	-	-	-	-
سویه ۳ <i>E. faecium</i>	+	-	-	-	-	+
سویه ۴ <i>E. faecium</i>	+	-	-	-	-	-
سویه ۵ <i>E. faecium</i>	+	-	-	-	-	+

بحث

از چندی قبل با توجه به ارزش تغذیه ای بالای پنیر، مطالعات گسترده ای برای بهبود خواص کمی و کیفی این محصول انجام شده است تا جایی که برای ارتقای سطح کیفی این فرآورده و تولید محصولات بازار پسندتر، توجه ویژه ای

روی پنیرهای سنتی و محلی موجود در سراسر دنیا شده است. در ایران نیز عمده ترین و مشهورترین پنیر سنتی، پنیر ليقوان تبریز است که به خاطر عطر و طعم مطلوب خود، بازار پسندی بالایی را در کشور دارا است. مدت زمان تولید این پنیر از زمان شروع شیر دوشی گوسفندها (یعنی اوایل بهار) الی اواخر شهریور می باشد. این پنیر جزء پنیرهای نیمه نرم است که دوره رسانیدن آن در محلول آب نمک ۱۱ الی ۱۲ درصد به مدت سه ماه صورت می گیرد و برای تهیه آن از شیر خام گوسفند استفاده می شود. در تهیه آن هیچ نوع کشت آغازگری به شیر اولیه افزوده نمی شود و فلور میکروبی طبیعی موجود در شیر خام است که در کنار پروتئازهای طبیعی شیر و رنت افزوده شده باعث تولید عطر و طعم خاص و مطلوب پنیر رسیده می گردد (نوید قاسمی، ۱۳۸۳).

عوامل متعددی بر روی خواص ارگانولپتیک پنیر موثر هستند، که از مهمترین آنها می توان به نوع شیر، کیفیت میکروبی آن، تکنولوژی مورد استفاده در تولید پنیر و شرایط رسیدن پنیر اشاره نمود. اما به هر حال، باکتریهای لاکتیک نقش عمده و مهمی را در ایجاد ترکیبات مسئول بهبود عطر و طعم در پنیر دارند. به طور کلی انتروکوکوس ها هم به عنوان آلوده کننده محیط و هم در نقش استارتر طبیعی که باعث توسعه خصوصیات ارگانولپتیکی پنیرهای کامل می شوند، مطرح هستند (ساران تینی پولوس و همکاران، ۲۰۰۲). انتروکوکوس عموماً در شیر خام و محصولات لبنی حضور دارد، چرا که شیر یک منبع مطلوب و ایده ال برای رشد این ارگانسیم ها شناخته شده است. انتروکوکوس ها به طور قابل توجهی می توانند در لخته پنیر و پنیرهای رسیده نیز حضور داشته باشند. بسیاری از تحقیقات، وجود انتروکوکوس را در شیر پاستوریزه و UHT و بقای آنها را در طی پروسه شیر تایید کرده اند (گاردینی و همکاران، ۲۰۰۱).

مشخص شده است که حضور انتروکوکوس برای تکوین آرومای پنیر در بسیاری از کشورهای جنوبی اروپا ضروری باشد. بسیاری از تحقیقات نشان داده است سویه های انتروکوکوس با منشا غذایی تاثیر مثبت روی رسیدگی پنیرهای سنتی دارد. انتروکوکوس شاید شیر را به طور مستقیم از مدفوع حیوان و یا به طور غیر مستقیم از منابع آبی، تجهیزات شیر دوشی و یا تانک ذخیره شیر آلوده کند. تعداد انتروکوکوسی در پنیرهای مدیترانه ای در لخته 10^6-10^4 CFU/g و در پنیر رسیده 10^7-10^5 CFU/g می باشد (اوگیر و همکاران، ۲۰۰۷).

در تحقیقاتی که اخیراً انجام شده است، مشخص شده است که انتروکوکوس ها جمعیت غالب میکروبی شیر خام را به خود اختصاص داده اند. بنابراین، با احتمال زیاد تاثیر قابل توجهی روی خواص کیفی و ارگانولپتیکی پنیر حاصل از آن داشته اند (نوید قاسمی زاد، ۱۳۸۳). در ترکیب پنیر سه ماهه ليقوان، انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس وجود دارند که با توجه به خواص پروتئولپتیک و لیپولپتیک، می توانند تاثیر ویژه ای روی خواص کیفی پنیر ليقوان بر جای بگذارند (نوید قاسمی زاد، ۱۳۸۳). علاوه بر این، در پنیرهایی نظیر: Teleme, Feta, Kefalotyric, Cebreiro, Serra Comte و Mozzarella, Manchego انتروکوکوس قسمت اعظم فلور میکروبی پنیر تازه دلمه شده را به خود اختصاص می دهد و در بعضی از موارد، میکروارگانسیم های برجسته و غالب در محصولات رسیده را شامل می شوند (ساران تینی پولوس، ۲۰۰۱).

پروتئولیز پروتئین های پنیر مهم ترین عامل تاثیر گذار در عطر و طعم پنیرهای حاصل است و تجزیه کازئین نقش مهمی در رسیدن و تکوین بافت پنیر ایفا می کند. علاوه بر این، اسیدهای چرب تولید شده در طی لیپولیز می توانند به متیل کتون ها و تیواسترها تبدیل شده و به عنوان ترکیبات دارای طعم شناخته شده ای تبدیل گردد. اسید آمینه ها مهمترین عوامل ایجاد کننده عطر و طعم در پنیر هستند. اسید آمینه ها با عملکرد سیستم های آنزیمی مبدل، به ترکیباتی مانند

آلدئیدها، الکلها، کتونها، آمین ها، اسیدها، استرها و ترکیبات سولفوردار که همگی در تولید عطر و طعم موثر هستند، تبدیل می گردند (ساران تینی پولوس، ۲۰۰۱).

انتروکوکوسی به علت فعالیت پروتئولیتیکی، استرولیتیکی و تولید دی استیل توسط متابولیسم سیترات باعث رسیدگی و تکوین آرومای پنیرهایی نظیر چدار، فتا، موزرلا، سبیریرو و وناکو می شود. به علت نقش انتروکوکوس در رسیدگی، توسعه آروما و تولید باکتریوسین در پنیرها، پیشنهاد شده است که انتروکوکوسی با ویژگی های تکنولوژیکی مطلوب و متابولیک می تواند در کنار استارترهای پنیرهای مختلف استفاده شود (اوگیر و همکاران، ۲۰۰۷).

در مجموع می توان اظهار کرد که حضور انتروکوکوس در مقادیر بالا در بسیاری از پنیرهای مختلف، در کمک به بهبود ویژگی های ارگانولپتیکی مواد غذایی تخمیری و توانایی آنها در تولید باکتریوسین ها (انتروسین) خصوصیات مهمی هستند که باید برای کاربرد آنها در تهیه مواد غذایی توسط فرآوری کننده ها مد نظر باشد (مورنو و همکاران، ۲۰۰۶).

پیشنهاد

اینکه حضور انتروکوکوسی در پنیرهای رسیده منجر به توسعه آروما می شود یا نه، هنوز موضوع جدال برانگیز است. بعضی از محققان بر این ادعا هستند که مقادیر زیاد انتروکوکوسی منجر به گندیدگی و ویژگی های نامطلوب در بعضی از پنیرها می شود. از طرف دیگر بسیاری از گزارشات دیگر اشاره به تاثیر مطلوب انتروکوکوسی در تولید و کیفیت پنیر دارند (ساران تینی پولوس و همکاران، ۲۰۰۲). بعلاوه تفاوت در برخی ویژگی های تکنولوژیکی (به ویژه فعالیت پروتئولیتیکی) می تواند منجر به انتخاب سویه های ویژه شده و بنابراین در کنار باکتری های لاکتیک اسید به عنوان استارتر در تولید پنیرهای سنتی استفاده شوند (سوزی و همکاران، ۲۰۰۰). عدم وجود فاکتورهای بیماریزایی و واگیر در سویه های وحشی انتروکوکوس فاسیوم نشان می دهد که آنها می توانند به عنوان استارترهای غیر سنتی برای ایجاد خصوصیات ارگانولپتیک و تضمین سلامت این پنیرها استفاده شوند (ساودرا و همکاران، ۲۰۰۳).

منابع مورد استفاده:

- [۱] نوید قاسمی زاد، سحر، ۱۳۸۳. شناسایی باکتری های لاکتیک در پنیر سنتی لبقوان. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
- [2]- Foulquie Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of food Microbiology* 106: 1-24.
- [3]- Fox, P.F., Guinee, T.P. and McSweeney, P.L.H., 2000. *Fundamental of cheese science*, Gaithersburg: Aspen Publisher, Inc.
- [4]- Gardini, F., Martuscelli, M., Carmela Caruso, M., Galgano, F., Crudele, M.A., Favati, F., Guerzoni, M.E. and Suzzi, G., 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology* 64: 105-117.
- [5]- Giraffa, G., 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 163-171.
- [6]- Girrafa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy product. *International Journal of Food Microbiology* 88: 215-222.
- [7]- Hardie, J.M. and Whiley, R.A., 1997, Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 83:1S-11S.
- [8]- Huycke, M., 1998. Multiple-drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infections Diseases* 4: 239-249.

- [9]- Lee, W.Sh., 1972. Improved procedure for identification of group D Enterococci with two new media. *Applied Microbiology* 24: 1-3.
- [10]- Lopez-Diaz, T.M., Alonso, C., Roman, C., Garcia-Lopez, M.L. and Moreno, B., 2000. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiology* 17: 23-32.
- [11]- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A. and Lodi, Roberta., 2006. Technological and molecular characterization of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *International Dairy Journal* 16: 867-875.
- [12]- Ogier, J.C. and Serror, P., 2007. Part VI: The Enterococcus genus. *International Journal of Food Microbiology* 2: 1-11.
- [13]- Psoni, L., Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E., 2003. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. *Food Microbiology* 20: 575-582.
- [14]- Saavedra, L., Taranto, M.P., Sesma, F. and Valdez, G.F., 2003. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International Journal of Food Microbiology* 88: 241-245.
- [15]- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G. and Tsakalidou, E., 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal* 11: 621-647.
- [16]- 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: 93-105.
- [17]- Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M.D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L., 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *International Journal of Food Microbiology* 72: 125-136.
- [18]- Suzzi, G., Caruso., 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 Italian goat's cheese (Semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology* 89:267-274.