

# Bakterie rodzaju *Enterococcus* w mleku i przetworach mleczarskich

MAŁGORZATA ZIARNO

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności Wydziału Technologii Żywności SGGW,  
ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa

Ziarno M.

## Bacteria of *Enterococcus* genus in milk and dairy products

Summary

*Enterococci* are widely present in nature and gain entry into raw milk and milk products through equipment, unsanitary and unhygienic production and handling conditions, as well as through the water supply. This short review describes current knowledge on the positive and negative importance of enterococci in relation to the dairy industry. These bacteria are important for ripening and developing the aroma of certain cheeses, especially traditional cheeses produced in the Mediterranean area. Their influence on the sensory properties of cheeses seems due to specific biochemical traits such as proteolysis and lipolytic activity, citrate utilisation, and production of aromatic volatile compounds. In many cheeses enterococci occur as non-starter lactic acid bacteria (NS-LAB), and they are also components of cheese starter cultures. Some enterococci are also used as probiotics and have the ability to produce bacteriocins (enterocins) and inhibit growth of food spoilage or pathogenic bacteria. Enterococci may also reduce serum cholesterol levels, but on the other hand, can spoil milk products and cause bacteraemia or other infections. Virulence factors such as adhesins, invasins and haemolysin are little known. There is evidence that enterococci in food may produce thermo stable biogenic amines provoking migraine attacks and even food poisoning. Some strains of enterococci are resistant to many antibiotics such as Vancomycin. Enterococcal strains isolated from food and clinical causes have demonstrated the ability to gene transfer Vancomycin and Tetracycline resistance among *Enterococcus* spp. and other bacteria. The role of enterococci in disease and food poisoning has raised questions concerning their safety for use as probiotics in the dairy industry.

**Keywords:** *Enterococcus* spp., dairy industry, antibiotic resistance

Rodzaj *Enterococcus* są to Gram-dodatnie paciorkowce, wywodzące się z dotychczasowych streptokoków grupy D, którym nadano nazwę „enterokoki”, w celu podkreślenia ich jelitowego pochodzenia. Dotychczas, wyizolowano i opisano blisko 30 gatunków enterokoków (1, 9, 16, 17). Jednak tymi o największym znaczeniu dla przemysłu mleczarskiego pozostają nadal głównie *E. faecium* i *E. faecalis*, po raz pierwszy wyizolowane z ludzkich jelit (1, 16, 31).

### Występowanie w mleku surowym i środowisku jego pozyskiwania

Enterokoki są częścią autochtonicznej mikroflory układu pokarmowego (głównie jelit) ssaków i ptactwa, skąd poprzez odchody oraz na skutek niedostatecznej higieny, dostają się na powierzchnię wymion, urządzeń do doju, zbiorników i dalej do mleka surowego (11, 16, 31). Są spotykane rzadko i w niewielkiej liczbie wśród mikroflory bytującej w zdrowym wymionie. Do mleka surowego mogą dostać się również poprzez zanieczyszczone odchodami wodę, obornik lub glebę. Mogą także znajdować się w powietrzu, uwalniane z błon śluzowych zwierząt lub ludzi. Kał bydła mlecznego jest zanieczyszczony głównie *E. faecium*, mniej *E. casseliflavus*, *E. fae-*

*calis*, które częściej dominują w kale ludzi (12, 13). W mleku surowym, uzyskanym podczas doju o wysokim poziomie higieny, ich udział w całkowitej mikroflorze zwykle nie przekracza ok. 10%, a najczęściej nie stwierdza się ich w 1 cm<sup>3</sup> surowca mleczarskiego (23). Podczas chłodniczego przechowywania mleka, bakterie te nie rozmnażają się intensywnie i dlatego ich liczba w mleku dostarczanym do mleczarni może być bezpośrednim wskaźnikiem higieny doju i czystości wymion. Badania wykazują, że na powierzchni sprzętu do doju oraz w wodzie stosowanej do mycia wymion krów i urządzeń do doju obecne są głównie *E. casseliflavus* i *E. faecalis*, co jednoznacznie wskazuje na prawdopodobne źródło tych bakterii w mleku (11-13, 31).

### Występowanie w przetworach mleczarskich

Enterokoki mogą stanowić istotny odsetek mikroflory żywności pochodzenia zwierzęcego oraz towarzyszącym jej przetwarzaniu procesom technologicznym (16, 19, 22, 31). Swoją wszechobecność zawdzięczają zdolności do rozwoju w zakresie temperatur 10-45°C (optimum 37°C), odporności na zamrażanie oraz podwyższone temperatury (przeżywają ogrzewania w temperaturze 60°C przez 30 min.), zdolności do rozwoju w szerokim

zakresie wartości pH (od 2,7 do 10) lub w środowisku zawierającym 6,5% NaCl (8, 16, 19). Mają również zdolność do wzrostu w temperaturze 45°C w obecności soli żółciowych (do 40% żółci). Ponieważ są odporne na niskie i podwyższone temperatury (zamrażanie, pasteryzację, suszenie), ich liczebność w produktach mleczarskich zależy od tego, ile tych bakterii przeżyje obróbkę termiczną surowca (proces pasteryzacji mleka) oraz od stopnia zanieczyszczenia mleka tymi bakteriami po obróbce termicznej (reinfekcji popasteryzacyjnych). Ich obecność w produktach mleczarskich wykorzystywana jest jako wskaźnik nie tylko jakości mikrobiologicznej surowca, ale również poziomu higieny produkcji. Parametry pasteryzacji mleka są głównym czynnikiem selekcyjnym te drobnoustroje z mleka surowego. Ponad połowa *Enterococcus* może przeżyć pasteryzację mleka systemem HTST (np. 72°C/15 s) i znacznie mniej – pasteryzację wysoką (np. 85°C/16 s). Pomimo swojej znacznej ciepłoporności, enterokoki nie przeżywają ogrzewania mleka w temperaturze ponad 90°C.

Obecność *Enterococcus* spp. stwierdzana jest w mlecznych produktach fermentowanych, w tym w serach twarogowych oraz serach podpuszczkowych, produkowanych zarówno z mleka surowego, jak i mleka pasteryzowanego. Najczęściej spotykanymi gatunkami są: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, ale zdarzają się również *E. mundtii*, *E. dispar*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. malodoratus* (1, 4, 6, 12-14, 31). Liczebność *Enterococcus* spp. w serach zależy od czystości mleka serowarskiego i stosowanych kultur zakwasu serowarskiego, technologii oraz higieny produkcji. W świeżo wyprodukowanej podpuszczkowej masie serowej początkowa liczba enterokoków może wynosić od  $10^3$  do  $10^6$  j.t.k./g, co wynika m.in. ze skoncentrowania składników (w tym mikroflory) mleka przerobowego o około 10 razy (23). Podczas dojrzewania serów podpuszczkowych liczba enterokoków może zmieniać się lub pozostać mniej więcej stała, co zależy od zróżnicowanej oporności szczepów tych bakterii m.in. na podwyższone stężenie soli i kwasowość masy serowej. W dojrzałych serach podpuszczkowych stwierdzany poziom enterokoków wynosi od  $10^3$  do  $10^7$  j.t.k./g (23). Należy pokreślić, że w wielu przypadkach nie stwierdza się enterokoków w 1 g dojrzałego sera podpuszczkowego, ale w niektórych serach produkowanych na południu Europy enterokoki są znaczącą częścią mikroflory, a ich liczba może wahać się w zakresie  $10^4$ - $10^8$  j.t.k./g produktu. W przypadku serów z mleka surowego, głównie tych otrzymywanych rzemieślniczo, poziom zanieczyszczenia enterokokami zależy głównie od jakości mikrobiologicznej użytego mleka, a same bakterie są traktowane jako niestarterowa mikroflora kwasząca (non-starter lactic acid bacteria, NS-LAB). Występowanie enterokoków, ale w niewielkiej liczbie, w serach z mleka pasteryzowanego tłumaczona jest ich ciepłopornością. Natomiast wysoki poziom zanieczyszczenia enterokokami serów z mleka pasteryzowanego (szczególnie tych otrzymywanych w warunkach przemysłowych i z użyciem kultur bakterii serowarskich) jednoznacznie wskazuje na złą higienę produkcji (14).

Obecność enterokoków w mleku zagęszczonym słodzonym świadczy o poziomie higieny produkcji, gdyż jednym z etapów obróbki termicznej mleka jest hartowanie, polegające na ogrzaniu mleka do temperatury ponad 100°C. *Enterococcus*, które dostaną się do mleka zagęszczonego słodzonego jako zanieczyszczenie wtórne (popasteryzacyjne), mogą powoli w nim rozwijać się, czemu dodatkowo może sprzyjać przetrzymywanie produktu w podwyższonej temperaturze. Czynnikiem hamującym rozwój enterokoków w mleku zagęszczonym słodzonym jest niska aktywność wodna, wynikająca z dodatku do mleka znacznych ilości cukru i podwyższenia zawartości suchej masy. W przypadku mleka zagęszczonego niesłodzonego zapewnienie prawidłowych warunków technologicznych uniemożliwia przeżycie tych bakterii z mleka surowego, ze względu na stosowaną bardzo wysoką obróbkę termiczną (sterylizację). Jedynie uchybienia technologiczne, higieniczne albo nieszczelność opakowania mogą spowodować, że w produkcie końcowym znajdą się enterokoki.

Obecność enterokoków w śmietance, śmietanie lub maśle jest ściśle skorelowana z ilością tych bakterii w mleku przerobowym. Wynika to z faktu, że podczas wirowania (odtłuszczenia) mleka obecne drobnoustroje w większości przechodzą do śmietanki, a tylko ich część pozostaje w mleku odtłuszczonym. W śmietance bakterie skupione są w fazie beztłuszczowej tzw. plazmie, bogatej w substancje odżywcze. Wysoka pasteryzacja śmietanki (w temperaturze ponad 90°C) zapewnia całkowite zniszczenie tej mikroflory. Natomiast długotrwałe przetrzymywanie śmietanki w podwyższonej temperaturze umożliwia powolny rozwój tych enterokoków, które dostały się do produktu po procesie pasteryzacji. W czasie produkcji masła, podczas zmaśniania i płukania wodą, ponad 90-95% enterokoków, obecnych w śmietance lub śmietanie, przechodzi do maślanek i wody płuczącej. W przypadku masła, o prawidłowym stopniu wygniecenia (kropelki wody o średnicy poniżej 7 µm) i prawidłowej zawartości wody, pozostałe enterokoki nie znajdują sprzyjających warunków do rozwoju z powodu braku przetrzeźnienia i składników odżywczych (31).

Występowanie i liczebność *Enterococcus* spp. w mleku w proszku zależy od temperatury w poszczególnych etapach produkcji: pasteryzacji, zagęszczania i suszenia. Proces produkcji mleka w proszku uwzględnia zastosowanie różnych parametrów pasteryzacji mleka przerobowego, od łagodnej pasteryzacji HTST (75°C/15 s) aż po wysoką pasteryzację (np. 135°C/30 s), co wpływa na stopień zniszczenia enterokoków pochodzących z surowca. Spośród tych enterokoków, które przetrwają pasteryzację, tylko pewna liczba może przeżyć późniejsze zagęszczanie i rozpyłowe suszenie mleka. Uchybienia technologiczne (reinfekcje popasteryzacyjne, przedłużony cykl produkcyjny, przetrzymywanie mleka w podwyższonej temperaturze) umożliwiają enterokokom dostanie się i namnożenie w mleku zagęszczonym. W takim przypadku mleko w proszku może zawierać więcej tych bakterii niż wynikałoby to z jakości higienicznej użytego surowca. Dlatego obecność *Enterococcus* spp. w mleku w proszku świadczy nie o jakości mikrobiologicznej użytego surowca, ale o poziomie higieny produkcji i pra-

widłowości procesu technologicznego. Podczas przechowywania mleka w proszku enterokoki giną, a tempo tego zjawiska zależy m.in. od zawartości wody w mleku w proszku, szczelności opakowania i temperatury przechowywania.

### Pozytywne znaczenie obecności w przetworach mleczarskich

Dość dobrze poznany jest pozytywny wpływ *Enterococcus* spp. na powstawanie cech smakowo-zapachowych mlecznych produktów fermentowanych, szczególnie serów podpuszczkowych dojrzewających. W wielu przypadkach bakterie te są świadomie stosowane jako składnik kultur serowarskich, gdyż w serach otrzymanych z ich dodatkiem stwierdza się korzystniejsze cechy sensoryczne oraz wyższą zawartość wolnych kwasów tłuszczowych i aminokwasów niż w serach wyprodukowanych z zastosowaniem tylko tradycyjnych kultur serowarskich. Dodatkową zaletą stosowania niepatogennych szczepów enterokoków jest to, że ze względu na lepszą tolerancję podwyższonej kwasowości i stężenia NaCl oraz na szeroki zakres temperatury rozwoju, przeżywiają w masie serowej dłużej niż tradycyjne bakterie serowarskie. Pozytywny wpływ enterokoków na cechy sensoryczne serów wynika m.in. ze zdolności do metabolizowania cytrynianów i wytwarzaniu aromatycznych substancji, właściwości proteolitycznych i lipolitycznych. Enterokoki wytwarzają takie składniki zapachowe, jak acetaldehyd, etanol, diacetyl (1, 21, 27). Enterokoki różnią się od innych bakterii mlekowych tym, że dostępność fermentowalnych węglowodanów zapobiega metabolizowaniu cytrynianów, natomiast u innych bakterii mlekowych, metabolizm cytrynianów i cukrów mogą zachodzić równocześnie (24, 27). Enterokoki stwierdzane w różnych serach podpuszczkowych wykazują często aktywność proteolityczną wyższą niż inne bakterie mlekowe (1, 6, 31). W serach dojrzewających, nawet jeśli stanowią mikroflorę z surowca lub reinfekcji, biorą udział w rozkładzie białek wytwarzając różne endo- i egzopeptydazy i przyczyniając się do rozkładu białek do peptydów, aminokwasów i innych prostych substancji azotowych (6). Korzystny wpływ obecności enterokoków w serach związany jest także ze zdolnościami tych bakterii do hydrolizy tłuszczu mlecznego i wytwarzaniu esteraz (27, 30).

Wykorzystanie niepatogennych szczepów *Enterococcus* spp. w procesie fermentacji może pozwolić na otrzymanie produktów o cennych walorach dietetycznych. Wynika to z właściwości tych bakterii: oporności na kwaśny odczyn środowiska, sole żółciowe, zdolności do wytwarzania substancji przeciwdrobnoustrojowych, do przeżywania i współzawodnictwa w układzie pokarmowym z inną mikroflorą. Już teraz niektóre szczepy enterokoków są z powodzeniem stosowane jako probiotyki dla ludzi lub zwierząt. Głównie są to szczepy z gatunku *E. faecium*, chociaż również mogą być stosowane szczepy *E. faecalis*. Wiele szczepów enterokoków wytwarza różne peptydy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, zwane enterocynami. W licznych doświadczeniach wykazano, że te bakteriocynty wykazują aktywność przeciw *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus*

*aureus*, *Vibrio cholerae*, *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp. (2, 3, 7, 10, 28). Zdolność enterokoków do wytwarzania bakteriocyn może być wykorzystana w serowarstwie do zapobiegania rozwojowi szkodliwej mikroflory, która może dostać się do mleka przerobowego lub masy serowej. Dzięki temu można poprawić bezpieczeństwo zdrowotne produktów lub przedłużyć ich trwałość (21, 26, 28).

Niektóre szczepy z rodzaju *Enterococcus* posiadają właściwości obniżania poziomu cholesterolu w serum krwi, co można z powodzeniem wykorzystać w produkcji mlecznych napojów fermentowanych o właściwościach probiotycznych (26, 29, 32). Badacze wskazują na różne mechanizmy obniżania poziomu cholesterolu przez enterokoki: asymilację cząsteczek cholesterolu do ściany komórkowej bakterii i/lub precypitację cholesterolu w kwaśnym środowisku wraz ze zdekonjugowanymi kwasami żółciowymi. Dekonjugację kwasów żółciowych katalizuje enzym hydrolaza soli żółciowych, której aktywność stwierdza się nie tylko u *Enterococcus* spp. ale także u innych Gram-dodatnich bakterii jelitowych (8, 25, 26, 29).

W niektórych krajach już teraz wykorzystuje się dodatki kultur enterokoków (wyselekcjonowanych szczepów *E. faecalis* lub *E. faecium*) w produkcji fermentowanych wyrobów mleczarskich, jednak nie do końca wyjaśnione oddziaływanie tych bakterii na organizm człowieka powstrzymuje przed powszechną akceptacją zastosowania szczepów tych bakterii.

### Negatywne znaczenie obecności w przetworach mleczarskich

Nie zawsze obecność enterokoków wytwarzających bakteriocynty w produktach mleczarskich jest pozytywna i pożądana. W efekcie obecności enterokoków wytwarzających enterocyny proces fermentacji może wydłużyć się lub nastąpi zmiana cech smakowo-zapachowych (np. tekstura serów dojrzewających będzie zbyt zamknięta, produkt będzie miał nietypowy smak, zapach, przebarwienia). Ponadto, wiele gatunków enterokoków ma właściwości proteolityczne, w tym wytwarza dekarboksylazę aminokwasową, która w warunkach beztlenowych powoduje powstawanie termostabilnych amin o nieprzyjemnym zapachu: tyraminy, histaminy, fenyletyloaminy, putrescyny, kadaweryny. Obecność tych biogennych amin uważana jest nie tylko za objaw zepsucia produktu, ale również za przyczynę reakcji alergicznych lub zatruc pokarmowych u ludzi (18, 20). Aminy takie mogą powstawać zarówno w serach podpuszczkowych, jak i twarogowych, uzyskanych z udziałem enterokoków o aktywności dekarboksylazy któregoś z aminokwasów. Jak wskazują dane piśmiennictwa, wyselekcjonowane szczepy enterokoków stosowane jako składniki kultur mleczarskich charakteryzują się bardzo słabym wytwarzaniem amin biogennych.

Uważa się, że *Enterococcus* spp. są mikroflorą jelitową oportunistyczną, która może stać się chorobotwórcza dla organizmu gospodarza. Większość gatunków enterokoków rzadko jest przyczyną bakteriiemii u ludzi, w warunkach szpitalnych sporadycznie stwierdza się *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. galli-*

*narum*, *E. raffinosus* (15, 19, 22). Wyjątkiem są *E. faecalis* i *E. faecium*, które często są obwiniane za infekcje błon śluzowych nosa, gardła, dróg moczowych oraz inne infekcje u ludzi. Niewiele wiadomo o czynnikach przyczyniających się do nabywania przez enterokoki zdolności do powodowania infekcji. Wiadomo, że enterokoki mają zdolność do kolonizacji tkanek, dzięki zdolnościom do wiązania się do specyficznych białek zewnątrzkomórkowych nabłonka jelit. Być może stąd przypuszczenie, że wiele enterokoków, które spowodowały infekcję, dostało się do organizmu przez układ pokarmowy. Jest to o tyle możliwe, że wiele szczepów np. *E. faecalis* izolowanych w warunkach klinicznych wytwarza cytolizynę (hemolizynę), hialuronidazę oraz inne substancje wykazujące zdolność uszkodzenia tkanek (6, 15, 22).

Coraz częściej odnotowuje się nabywanie przez bakterie z rodzaju *Enterococcus* oporności na antybiotyki glikopeptydowe (glycopeptide-resistant enterococci, GRE), a szczególnie na wankomycynę (vancomycin-resistant enterococci, VRE) (6, 16, 19, 22). Szczepy odporne na antybiotyki glikopeptydowe, w tym wankomycynę stwierdza się nie tylko w warunkach klinicznych, ale także w mleku surowym i produktach mleczarskich (4). Z piśmiennictwa znane są przykłady przenoszenia antybiotykooporności w obrębie i poza obrębem gatunku. W warunkach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że plazmidy, na których kodowana jest antybiotykooporność, mogą zostać przeniesione z komórek *E. faecalis* lub *E. faecium* do komórek *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp. (5). Należy pamiętać, że istnieje wiele bakterii posiadających naturalny wysoki i stały poziom oporności. Wymienić należy takie rodzaje bakterii mlekowych, jak *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, które współistnieją z enterokokami w przewodzie pokarmowym ludzi i w niektórych produktach mleczarskich. Jak wskazują badania niemieckie, istnieje możliwość przekazywania genu oporności na wankomycynę lub tetracyklinę między drobnoustrojami podczas procesu fermentacji (5).

Nabywanie antybiotykooporności przez *Enterococcus* spp. oraz powszechne ich występowanie stają się szybko problemem bezpieczeństwa zdrowotnego produkcji żywności. Możliwość rozprzestrzeniania się takich szczepów enterokoków wraz z żywnością oraz dostania się ich do organizmu człowieka, gdzie w sprzyjających warunkach mogą być przyczyną trudno uleczalnych infekcji, zapewne na trwałe uniemożliwi pełne wykorzystanie ich pozytywnych właściwości w przemyśle mleczarskim.

## Piśmiennictwo

1. Andrighetto C., Knijff E., Lombardi A., Torriani S., Vancanneyt M., Kersters K., Swings J., Dellaglio F.: Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J. Dairy Res.* 2001, 68, 303-316.
2. Bennik M.H.J., Vanloo B., Brousseau R., Gorris L.G.M., Smid E. J.: A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: Full characterization and interaction with target organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1998, 1373, 47-58.
3. Cintas L. M., Casaus P., Herranz C., Havarstein L. S., Holo H., Hernandez P. E., Nes I. F.: Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 2000, 182, 6806-6814.
4. Citak S., Yucel N., Orhan S.: Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 2004, 57, 27-31.
5. Cocconcelli P. S., Cattivelli D., Gazzola S.: Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 88, 315-323.
6. Delgado S., Delgado T., Mayo B.: Technological performance of several *Lactococcus* and *Enterococcus* strains of dairy origin in milk. *J. Food Prot.* 2002, 65, 1590-1596.
7. Franz C. M. A. P., Schillinger U., Holzapfel W. H.: Production and characterisation of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol.* 1996, 29, 255-270.
8. Franz C. M. A. P., Schleifer K. H., Stiles M. E., Holzapfel W. H.: Enterococci in foods: a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 88, 105-122.
9. Franz C. M. A. P., Specht I., Haberer P., Holzapfel W. H.: Bile salt activity of enterococci isolated from food: screening and quantitative determination. *J. Food Prot.* 2001, 64, 725-729.
10. Franz C. M. A. P., Worobo R. W. W., Quadri L. E. N., Schillinger U., Holzapfel W. H., Vederas J. C., Stiles M. E.: A typical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 2170-2178.
11. Garg S. K., Mital B. K.: Enterococci in milk and milk products. *Crit. Rev. Microbiol.* 1991, 18, 15-45.
12. Gelsomino R., Vancanneyt M., Cogan T. M., Condon S., Swings J.: The source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 3560-3565.
13. Gelsomino R., Vancanneyt M., Condon S., Swings J., Cogan T. M.: Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, 71, 177-188.
14. Giraffa G., Carminati D., Neviani E.: Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Prot.* 1997, 60, 732-738.
15. Kayaoglu G., Orstavik D.: Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2004, 15, 308-320.
16. Klein G.: Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 88, 123-131.
17. Kusuda R., Kawai K., Salati F., Banner C. R., Fryer J. L.: Enterococcus seriolida sp. nov., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991, 41, 406-409.
18. Leuschner R. G. K., Kurihara R., Hammes W. P.: Formation of biogenic amines by proteolytic enterococci during cheese ripening. *J. Sci. Food Agric.* 1999, 79, 1141-1144.
19. Lukasova J., Sustackova A.: Review article: enterococci and antibiotic resistance. *Acta Vet. Brno* 2003, 72, 315-323.
20. Novella-Rodriguez S., Veciana-Nogues M. T., Roig-Sagues A. X., Trujillo-Mesa A. J., Vidal-Carou M. C.: Influence of starter and nonstarter on the formation of biogenic amine in goat cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* 2002, 85, 2471-2478.
21. Oumer B. A., Gaya P., Fernandez-Garcia E., Marciaca R., Garde S., Medina M., Nunez M.: Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin producing adjunct culture. *J. Dairy Res.* 2001, 68, 117-129.
22. Peters J., Mac K., Wichmann-Schauer H., Klein G., Ellerbroek L.: Enterococci in foods. Functional and safety aspects. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 88, 311-314.
23. Pluta A., Rutka A., Berthold A.: Zmienność mikroflory w czasie produkcji serów typu holenderskiego o różnej zawartości tłuszczu. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 998-1001.
24. Rea M. C., Cogan T. M.: Glucose prevents citrate metabolism by enterococci. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 88, 201-206.
25. Rince A., Le Breton Y., Verneuil N., Giard J.-Ch., Hartke A., Auffray Y.: Physiological and molecular aspects of bile salt response in *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 88, 207-213.
26. Saavedra L., Taranto M. P., Sesma F., Font de Valdez G.: Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 88, 241-245.
27. Sarantinopoulos P., Andrighetto C., Georgalaki M. D., Rea M. C., Lombardi A., Cogan T. M., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E.: Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int. Dairy J.* 2001, 11, 621-647.
28. Sarantinopoulos P., Leroy F., Leontopoulou E., Georgalaki M., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E., De Vuyst L.: Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek feta cheese making. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 72, 125-136.
29. Taranto M. P., De Llano D. G., Rodriguez A., De Ruiz Holgado A. P., De Valdez G. F.: Bile tolerance and cholesterol reduction by *Enterococcus faecium*, a candidate microorganism for the use as a dietary adjunct in milk products. *Milchwissenschaft* 1996, 51, 383-385.
30. Tsakalidou E., Manolopoulou E., Tsilibari V., Georgalaki M., Kalantzopoulos G.: Esterolytic activities of *Enterococcus durans* and *Enterococcus faecium* strains isolated from Greek cheese. *Neth. Milk Dairy J.* 1993, 47, 145-150.
31. Wessels D., Jooste P. J., Mostert J. F.: Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolates from milk and dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 1990, 10, 349-352.
32. Zaccani C., Bottazzi V., Ribecchi A., Bosi E., Sarra P. G., Tagliaferro L.: Serum cholesterol levels in axenic mice colonised with *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiologica* 1992, 15, 413-418.