معرفی و مقایسه روش‌های اندازه‌گیری خواص ضدکپکی باکتری‌های لاکتیکی در پنیر

حسین صداقت[۱]، محمدهادی اسکندری[۲*]، مرضیه موسوی‌نسب[۳]، سیدشهرام شکرفروش[۴]، محمدامین حنیف‌پور[۵]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۲- استادیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۳- دانشیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۴- استاد بخش بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۵- مشاور صنعتی و مدیر عامل شرکت شیر پگاه فارس، شیراز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: eskandar@shirazu.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۲/۱۰/۳ پذیرش نهایی: ۹۳/۳/۳)

Archive of SID

چکیده

روش‌های آزمایشگاهی مختلفی برای بررسی اثر ضدکپکی باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک ابداع شده است که بیشتر آن‌ها در سطح محیط کشت این اثرات را بررسی می‌کنند. اما به دلیل ترکیبات موجود در غذا و پیچیدگی روابط اجزای آن در بسیاری موارد ممکن است اثرات دیده شده در محیط کشت، در غذای واقعی دیده نشود. پژوهش‌های مختلف در این رابطه بیشتر ظاهر نشدن کپک در سطح مواد غذایی را معیاری برای خاصیت ضدکپکی میکروارگانیسم‌های درون غذا دانسته‌اند. از این رو ابداع و مقایسه روش‌های کارآمد جهت بررسی خاصیت ضدکپکی باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک در مواد غذایی مفید می‌باشد. در این بررسی از باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک تولیدکننده مواد ضدقارچی در تولید پنیر استفاده شد و با استفاده از روش‌های مختلف شامل آزمون Overlay قطعات پنیر، آزمون Microdilution عصاره‌های پنیر و رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر، اثر ضدقارچی این باکتری‌ها بر علیه دو کپک *Aspergillus flavus* و *A. parasiticus* بررسی شد. مقایسه نتایج مربوط به باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک و استارتر معمول در تولید پنیر، کارآمد بودن هر سه آزمون را در نشان دادن تفاوت بین نمونه‌ها، نشان داد. مقایسه نتایج آزمون‌ها با یکدیگر نشان داد که نتایج آزمون Overlay قطعات پنیر و رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر با هم همبستگی مثبت و معنی‌داری داشته و این دو آزمون همانند هم اثر ضدقارچی باکتری‌ها را که شامل برهم‌کنش خود باکتری بر علیه کپک‌ها و همچنین تولید مواد ضدقارچی است، مشخص می‌سازند. البته به دلیل اینکه نمی‌توان OD را سنجشی برای رشد کپک دانست، استفاده از آزمون Microdilution در این مورد توصیه نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک، پنیر، ضدکپک، آزمون Microdilution، آزمون Overlay

www.SID.ir

مقدمه

امروزه علاقه مردم به غذاهای عاری از مواد شیمیایی افزایش یافته است. این موضوع اهمیت استفاده از کشت‌های میکروبی محافظت‌کننده را نشان می‌دهد. اصطلاح Biopreservation به کنترل یک میکروارگانیسم توسط میکروارگانیسم دیگر اطلاق می‌گردد که در سال‌های اخیر اهمیت زیادی پیدا کرده است (Magnusson *et al.*, 2003). نگه‌دارنده‌های بیولوژیکی مدت زمان ماندگاری را طولانی‌تر می‌کنند و سلامتی غذا را به خاطر فلور میکروبی طبیعی یا تکمیلی و محصولات ضدمیکروبی بهبود می‌بخشند (Schnürer and Magnusson, 2003). واکنش بین قارچ‌های مولد توکسین و دیگر میکروارگانیسم‌ها یک پدیده معمول در طبیعت است که می‌تواند رشد قارچ و تولید مایکوتوکسین‌ها را تحت تاثیر قرار دهد (Hassan and Bullerman, 1997).

باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک با تولید چندین ترکیب ضدمیکروبی قادرند میکروارگانیسم‌های پاتوژن و مولد فساد را در مواد غذایی کنترل کنند. استفاده از باکتری های مولد اسیدلاکتیک برای کنترل رشد کپک‌ها می‌تواند یک جایگزین مناسب برای نگه‌دارنده‌های شیمیایی باشد که علاوه بر تولید مواد ضدقارچی، می‌توانند نقش مثبتی در طعم، بافت و ارزش تغذیه‌ای غذا داشته باشند (Arendt *et al.*, 2007; Guldfeldt *et al.*, 2001). گزارش‌هایی مبنی بر کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها و افزایش زمان نگه‌داری توسط باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک در محصولات تخمیری ارائه شده است که نشان دهنده کاهش خطرات تهدید کننده سلامتی توسط مایکوتوکسین‌ها می‌باشد (Gourama and Bullerman, 1995).

جهت انتخاب باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک به عنوان یک نگه‌دارنده بیولوژیکی، در ابتدا می‌بایست اثرات آن‌ها را بر علیه میکروارگانیسم‌های مورد نظر در محصولات غذایی هدف، بررسی نمود. روش‌های آزمایشگاهی مختلفی برای بررسی اثر ضدمیکروبی باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک ابداع شده است که بیشتر آن‌ها در سطح محیط کشت این اثرات را بررسی می‌کنند. این در حالی است که به دلیل ترکیبات موجود در غذا و پیچیدگی روابط بین اجزای آن در بسیاری از موارد ممکن است اثرات دیده شده در محیط کشت، در غذای واقعی دیده نشود.

در مورد استفاده از باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک به عنوان یک نگه‌دارنده بیولوژیکی جهت مهار آلودگی‌های باکتریایی، شمارش اختصاصی باکتری‌های آلوده‌کننده یک معیار مناسب جهت تعیین میزان مهارکنندگی باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک بر علیه این باکتری‌ها است و در پژوهش‌های گوناگون به عنوان یک روش معمول و کارآمد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Settanni *et al.*, 2011; Speranza *et al.*, 2009).

از آنجایی که کپک‌ها برای تکثیر تولید اسپور می‌کنند، لذا امکان ارزیابی میزان رشد آن‌ها از طریق شمارش تعداد امکان‌پذیر نمی‌باشد و جهت بررسی میزان رشد یا مهار رشد کپک‌ها در مواد غذایی می‌بایست به دنبال روش‌هایی غیر از شمارش بود. در این رابطه، پژوهش‌های مختلف عمدتاً رشد مستقیم کپک را در سطح مواد غذایی مد نظر قرار داده و عدم ظهور پرگنه کپک در سطح مواد غذایی را معیاری برای خاصیت

www.SID.ir

ضدکپکی میکروارگانیسم‌های درون غذا دانسته‌اند (Lynch *et al.*, 2013). از این رو ابداع و مقایسه روش‌هایی کارآمد جهت بررسی خاصیت ضدکپکی باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک در مواد غذایی مفید می‌باشد.

در این تحقیق از باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک تولیدکننده مواد ضدقارچی در تولید پنیر سفید استفاده شد و با استفاده از روش‌های مختلف اثرات ضدکپکی آن‌ها در پنیرهای تولیدی مورد بررسی قرار گرفت تا با مقایسه نتایج به دست آمده بتوان ویژگی این آزمون‌ها را مشخص کرد و با مقایسه آن‌ها، کارآمدی و موارد استفاده هر کدام را بررسی نمود.

مواد و روش‌ها

روش تهیه تولید پنیر

جهت تهیه مخلوط اولیه برای تولید پنیر از ۱۱/۲ درصد شیرخشک، ۱۰ درصد کنسانتره پروتئین شیر، ۳/۵ درصد کنسانتره پروتئین آب پنیر، ۱۴ درصد پودر خامه ۵۹ درصد چربی (شرکت پگاه فارس) و ۲ درصد نمک استفاده شد. سپس آب با دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مخلوط پودرهای مورد نظر افزوده شد و به منظور هیدراته شدن پودرها، به مخلوط یک ساعت زمان داده شد. سپس فرآیند همگن‌سازی در فشار ۱۵۰ بار و دمای ۵۰ درجه سلسیوس و پاستوریزاسیون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس و زمان ۳۰ دقیقه اعمال شد. پس از آن مخلوط تا دمای ۳۰ درجه سلسیوس به منظور تلقیح باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک و یا استارتر سرد گردید.

از باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک که در تحقیق دیگری از منابع طبیعی جدا و خالص سازی شده و خواص ضدکپکی آن‌ها در سطح محیط کشت اثبات شده بود، در تولید پنیر استفاده شد. این باکتری‌ها شامل، *L. plantarum* PIN، *L. plantarum* CAG23، *L. casei* H39، *L. pentosus* D31، *L. plantarum* NBRC107151، *L. plantarum* KU13 بودند (جعفرپور، ۱۳۹۰). باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک با تعداد ۸ واحد لگاریتمی (۸ log cfu/g) در هر گرم و استارتر R-704 (Christian-Hansen, Denmark) به میزان ۱ گرم در ۱۰۰ کیلوگرم اضافه شد. پس از تلقیح باکتری‌ها و استارتر، نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس تا رسیدن به pH برابر با ۵/۶ زمان نگه‌داری گردید. در ادامه رنین به میزان ۲ گرم در ۱۰۰ کیلوگرم اضافه شد و برای تکمیل انعقاد، پنیرها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. در نهایت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و تا رسیدن به pH حدود ۴/۸ تا ۵ گرمخانه‌گذاری گردید.

تهیه سوسپانسیون اسپور کپک

در این تحقیق اثر باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک بر روی دو کپک *A. flavus* PTCC 5004 (PTCC 5004) و *A. parasiticus* PTCC 5286 (PTCC 5286) (مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران) بررسی شد. جهت آماده‌سازی و تهیه سوسپانسیون حاوی تعداد مشخص کپک، ابتدا کپک‌های مورد نظر روی محیط کشت Malt extract Agar (MEA) در لوله آزمایش و به صورت مورب کشت داده شد. لوله‌های محتوی کپک در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و به مدت ۴ تا ۷ روز گرمخانه‌گذاری شدند. پس از این مدت در هر لوله سوسپانسیونی از اسپورهای کپک با آب مقطر استریل

Archive of SID
www.SID.ir

تهیه شد. سوسپانسیون تولیدی به لوله استریل دیگری منتقل شد و به منظور جدا شدن اسپورهای تولیدی از هم، به مدت ۵ دقیقه مخلوط گردید. سپس با استفاده از لام هموسایتومتر زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ شمارش اسپور انجام شد. در نهایت میزان آب لازم جهت رقیق‌سازی سوسپانسیون اولیه و رسیدن به سوسپانسیونی با تعداد اسپور مورد نظر محاسبه شد.

طرح مطالعه

جهت انجام آزمون Microdilution و آزمون تعیین خواص ضد قارچی قطعات پنیر به روش Overlay، ۶ نمونه پنیر که هر کدام حاوی یکی از باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک مورد مطالعه بودند، در ظروف ۴۰۰ گرمی تولید شد. همچنین یک نمونه پنیر نیز با استارتر R-704 جهت مقایسه با باکتری‌های مورد مطالعه تولید شد. جهت بررسی میزان رشد مستقیم کپک‌ها بر سطح پنیر، ۶ نمونه پنیر که هر کدام حاوی یکی از باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک مورد مطالعه بودند، درون پلیت‌های استریل تهیه و همچنین یک نمونه نیز با استارتر R-704 جهت مقایسه با باکتری‌های مورد مطالعه تولید گردید.

آزمون Microdilution عصاره پنیر

در این آزمون فعالیت ضد کپکی عصاره پنیرهای تولید شده مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار از پنیرها، عصاره بدون سلول تهیه شد. برای تهیه عصاره بدون سلول پنیرها، ۱۰ گرم از پنیرهای تولیدی با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل هموژن شد و پس از سانتریفوژ کردن، مایع رویی از فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد. آزمون بر روی این مایع و در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. برای این کار ۱۵۰ میکرولیتر از محیط کشت Sabouraud Dextrose Broth به هر چاهک افزوده شد و ۱۵۰ میکرولیتر عصاره بدون سلول به چاهک اول افزوده شد و رقیق‌سازی سریالی در چاهک‌های بعدی انجام گرفت. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محلول اسپور کپک‌های مورد آزمایش با تعداد ۵ واحد لگاریتمی اسپور در هر میلی‌لیتر به تمام چاهک‌ها اضافه گردید. پس از انجام این مراحل، پلیت به دستگاه میکروپلیت ریدر (مدل Micro 200R ساخت آمریکا) انتقال داده شد و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری انجام شد و هر نیم ساعت یک بار OD چاهک‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه قراعت گردید. نتایج این آزمون به صورت نمودار OD در مقابل زمان به دست آمد.

جهت تفسیر نتایج از مساحت سطح زیر منحنی Area under the curve (AUC) استفاده شد. برخی محققین از مساحت سطح زیر نمودار جهت نشان دادن میزان رشد میکروارگانیسم استفاده کردند و آن را بهترین پارامتر برای این کار معرفی نمودند Tiina *et al.*, 2009; (Gutierrez and Sandholm, 1989). برای محاسبه سطح زیر منحنی از روش ذوزنقه‌ای مطابق فرمول زیر استفاده شد (Pruessner *et al.*, 2003).

$$AUC = \sum_{i=1}^{n-1}\left(\frac{(m_{(i+1)} + m_i).t_i}{2}\right) - m_1 . \sum_{i=1}^{n-1} t_i$$

در این معادله i دفعات قرائت OD توسط دستگاه، n تعداد کل دفعات قرائت دستگاه که در این آزمایش ۹۷ می‌باشد، m مقادیر OD قرائت شده توسط دستگاه و t فواصل زمانی بین قرائت‌های دستگاه است که در این جا ۰/۵ می‌باشد.

www.SID.ir
Archive of SID

آزمون تعیین خواص ضدقارچی قطعات پنیر به روش Overlay

در این آزمون از پنیرهای تولیدی قطعات استوانه‌ای شکل با ارتفاع ۲ تا ۳ میلی‌متر تهیه و در وسط پلیت قرار داده شد. پس از آن محیط مذاب MEA تا سطح پنیرها اضافه شد. پس از آن به محیط کشت فرصت داده شد تا منعقد گردد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از محیط MEA حاوی ۰/۷ درصد آگار به همراه ۱ میلی‌لیتر محلول اسپور کپک مورد نظر با تعداد ۴ لوگ اسپور در میلی‌لیتر به سطح هر پلیت اضافه شد. پلیت‌های آماده شده به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پس از اتمام زمان گرمخانه‌گذاری از نمونه‌ها در شرایط یکسان به لحاظ نور و فاصله نمونه تا دوربین، عکس تهیه شد. پس از تهیه عکس از نمونه‌ها، توسط نرم افزار Image J (Rawak software) مساحت هاله بازدارندگی رشد، مساحت قطعه پنیر مورد آزمایش و مساحت کل پلیت محاسبه شد. به دلیل تفاوت‌های جزئی که در مساحت قطعات پنیر مورد آزمایش وجود داشت مساحت هاله خالص بازدارندگی محاسبه شد که از تفاضل مساحت هاله بازدارندگی و مساحت قطعه پنیر مورد آزمایش محاسبه می‌شود. برای محاسبه درصد بازدارندگی رشد از معادله استفاده شد:

$$\text{درصد بازدارندگی از رشد} = \frac{(\text{مساحت قطعه پنیر} - \text{مساحت هاله بازدارندگی رشد})}{\text{مساحت کل پلیت}} \times ۱۰۰$$

آزمون بررسی میزان رشد مستقیم کپک‌ها بر سطح پنیر

در این آزمون پس از تولید پنیر، به سطح تمام نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی اسپور کپک‌های *A. flavus* و *A. parasiticus* با تعداد ۴ لوگ اسپور در میلی‌لیتر اضافه شد. سپس پنیرهای تولید شده در دماهای ۴، ۱۵ و ۳۰ درجه سلسیوس نگه‌داری شده و زمان ظاهر شدن کپک روی نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز آماری

برای انجام آنالیز داده‌ها و بررسی اطلاعات به دست آمده از آزمون‌های مختلف از طرح بلوک‌های کامل تصادفی استفاده شد. به منظور تعیین اختلاف بین میانگین اعداد (حداقل سه تکرار برای هر آزمایش)، پس از آنالیز واریانس از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ($P<۰/۰۵$) استفاده گردید. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 صورت گرفت. تعیین ضرایب همبستگی با روش پیرسون و با استفاده از نرم افزار Minitab انجام گرفت.

یافته‌ها

آزمون Microdilution عصاره پنیر

نتایج مساحت سطح زیر منحنی در این آزمون در مورد کپک *A. flavus* در جدول (۱) آورده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود به جز زمان صفر، در هر کدام از زمان‌های آزمایش عصاره پنیرهای تولید شده با باکتری‌های *L. pentosus* H39 و *L. casei* D31 دارای کمترین میزان مساحت سطح زیر منحنی هستند که نشان دهنده این است که در بین عصاره پنیرهای مورد آزمایش، بیشترین اثر ضدقارچی را داشته‌اند. همچنین عصاره پنیر تولیدی با باکتری *L. plantarum* KU13 دارای بیشترین مساحت سطح زیر منحنی است و

Archive of SID
www.SID.ir

بنابراین دارای کمترین اثر ضدقارچی در بین باکتری‌های مورد آزمایش می‌باشد.

در مورد اثر زمان بر نتایج این آزمون، غیر از زمان صفر، نتایج بقیه زمان‌ها تفاوت معنی‌داری با هم ندارند و هر کدام ازعصاره‌های پنیر نتایج نسبتاً یکسانی را در زمان‌های مختلف از خود نشان داده‌اند. در زمان صفر هیچ کدام از نمونه‌ها با هم تفاوت آماری نداشته و هر نمونه در زمان صفر نسبت به سایر زمان‌ها، سطح زیر منحنی بیشتری دارد. البته این مورد در عصاره پنیر تولیدی با استارتر پنیر مشاهده نمی‌شود و در تمام زمان‌های آزمایش میزان سطح زیر منحنی این نمونه بالا است.

نتایج سطح زیر منحنی در مورد کپک *A. parasiticus* در جدول (۲) آمده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود به جز زمان صفر، عصاره پنیرهای تولید شده با باکتری‌های *L. plantarum* NBRC107151 و *L. casei* D31 دارای کمترین میزان مساحت سطح زیر منحنی هستند که نشان‌دهنده این است که در بین عصاره پنیرهای مورد آزمایش، بیشترین اثر ضدقارچی را داشته‌اند. همچنین عصاره پنیر تولیدی با باکتری *L. plantarum* KU13 دارای بیشترین مساحت سطح زیر منحنی است و بنابراین دارای کمترین اثر ضدقارچی در بین باکتری‌های مورد آزمایش می‌باشد.

در این آزمون نیز مانند آزمون مشابه بر روی کپک *A. flavus* در مورد اثر زمان بر نتایج این آزمون، غیر از زمان صفر، نتایج زمان‌های مختلف آزمایش تفاوت معنی‌داری با هم ندارند و عصاره پنیرهای مورد آزمایش نتایج نسبتاً یکسانی در زمان‌های مختلف از خود نشان دادند. این آزمون در مورد ارزیابی اثر ضدمیکروبی مواد مختلف مانند اسانس‌های گیاهی کاربرد داشته است و در این تحقیق برای اولین بار در مورد نشان‌دادن اثر ضدقارچی باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک در محیط پنیر استفاده شد.

جدول ۱- مساحت سطح زیر نمودار حاصل از آزمون Microdilution روی کپک *Aspergillus flavus*

هفته	باکتری						
	L.pentosus H39	*L.plantarum KU13*	*L.plantarum NBRC107151*	*L.casei D31*	*L.plantarum CAG23*	*L.plantarum PIN*	استارتر
۰	۲۲/۸۰ ± ۲/۵۴^{Aa}	۲۱/۳۲ ± ۰/۶۳^{Aa}	۱۹/۵۸ ± ۰/۲۸^{Aa}	۲۱/۲۱ ± ۱/۹۳^{Aa}	۲۳/۲۳ ± ۱/۹۵^{Aa}	۲۰/۷۸ ± ۲/۵۳^{Aa}	۲۳/۲۸ ± ۱/۱۹^{Ab}
۲	۷/۸۸ ± ۱/۱۶^{Bbc}	۱۴/۲۲ ± ۲/۰۰^{Ba}	۹/۸۰ ± ۱/۷۲^{Bbc}	۵/۸۲ ± ۰/۳۸^{Bc}	۱۱/۳۲ ± ۱/۹۷^{Bab}	۹/۹۱ ± ۱/۴۲^{Bbc}	۱۵/۱۵ ± ۱/۰۹^{Da}
۴	۸/۶۳ ± ۰/۵۳^{Bde}	۱۵/۲۷ ± ۱/۶۵^{Bb}	۱۰/۶۶ ± ۱/۲۷^{Bcd}	۵/۶۵ ± ۰/۷۷^{Be}	۱۳/۴۱ ± ۱/۱۳^{Bbc}	۱۰/۴۵ ± ۱/۳۸^{Bcd}	۲۵/۵۲ ± ۲/۱۲^{Aa}
۶	۶/۹۰ ± ۰/۴۵^{Bd}	۱۶/۰۵ ± ۱/۲۴^{Bab}	۹/۴۹ ± ۰/۹۱^{Bcd}	۷/۳۴ ± ۰/۶۲^{Bcd}	۱۲/۸۷ ± ۱/۶۱^{Bdb}	۱۲/۷۲ ± ۱/۷۷^{Bbc}	۱۹/۵۲۲ ± ۱/۸۴^{Ca}
۸	۹/۰۱ ± ۰/۲۸^{Bd}	۱۷/۶۶ ± ۰/۶۴^{Bb}	۹/۱۳ ± ۱/۱۴^{Bd}	۶/۱۸ ± ۰/۴۵^{Bd}	۱۳/۴۴ ± ۱/۷۳^{Bc}	۸/۷۹ ± ۰/۵۵^{Bd}	۲۱/۰۷ ± ۱/۸۱^{BCa}

- حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف است ($p<۰/۰۵$).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲ - مساحت سطح زیر نمودار حاصل از آزمون Microdilution روی کپک *Aspergillus parasiticus*

هفته	باکتری						
	L.pentosus H39	*L.plantarum KU13*	*L.plantarum NBRC107151*	*L.casei D31*	*L.plantarum CAG23*	*L.plantarum PIN*	استارتر
۰	۲۲/۵۲ ± ۲/۲۷^{Aab}	۱۵/۲۴ ± ۲/۹۶^{Ac}	۱۹/۸۲ ± ۳/۸۸^{Abc}	۱۵/۶۵ ± ۲/۷۳^{Ac}	۲۷/۲۰ ± ۰/۰۸^{Aa}	۲۲/۵۴ ± ۳/۱۰^{Aab}	۲۰/۶۳ ± ۲/۴۸^{Aabc}
۲	۱۰/۸۶ ± ۱/۶۳^{Bbc}	۱۵/۷۴ ± ۱/۱۲^{Aa}	۱۰/۳۶ ± ۱/۴۱^{Bc}	۸/۴۴ ± ۱/۵۲^{Bc}	۱۴/۲۱ ± ۰/۹۰^{Bab}	۱۱/۹۳ ± ۱/۶۴^{Bbc}	۱۷/۳۴ ± ۱/۴۰^{Aa}
۴	۹/۱۱ ± ۰/۵۳^{Bc}	۱۵/۹۰ ± ۱/۳۷^{Aa}	۷/۹۰ ± ۲/۹۲^{BCcd}	۴/۰۰ ± ۲/۲۵^{BCd}	۱۴/۶۰ ± ۱/۷۰^{Bab}	۱۰/۸۹ ± ۲/۰۸^{Bbc}	۱۷/۱۶ ± ۲/۴۴^{Aa}
۶	۱۱/۰۶ ± ۱/۰۶^{Bcd}	۱۵/۶۷ ± ۲/۰۵^{Ab}	۱۲/۰۶ ± ۰/۲۶^{Bc}	۷/۵۸ ± ۲/۲۰^{Bd}	۸/۵۸ ± ۱/۳۰^{Ccd}	۹/۹۸ ± ۱/۲۲^{Bcd}	۲۰/۲۱ ± ۱/۲۷^{Aa}
۸	۸/۳۹ ± ۱/۷۷^{Bb}	۱۲/۳۷ ± ۰/۰۰^{Ab}	۳/۴۰ ± ۰/۱۸^{Cc}	۱/۴۷ ± ۰/۳۲^{Cc}	۱۱/۸۵ ± ۲/۵۰^{BCb}	۱۰/۵۹ ± ۱/۸۲^{Bb}	۱۶/۷۴ ± ۲/۳۲^{Aa}

- حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف است (P<۰/۰۵).

تعیین خواص ضدقارچی قطعات پنیر به روش Overlay

نتایج درصد بازدارندگی بر علیه رشد کپک‌های مورد آزمایش در جداول ۳ و ۴ آمده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، غیر از پنیر تولیدی با باکتری *L. casei* D31، بین تمامی نمونه‌های تولیدی پنیر با باکتری‌های مولد اسید لاکتیک و نمونه‌ی تولیدی با استارتر پنیر به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود داشت. در بین پنیرهای تولیدی با باکتری‌های مولد اسید لاکتیک، پنیرهای تولید شده با دو باکتری *L. plantarum* PIN و *L. plantarum* CAG23 بیشترین درصد بازدارندگی را بر علیه رشد هر دو کپک داشتند و پنیر تولید شده با باکتری *L. casei* D31 کمترین درصد بازدارندگی را نشان داد، به طوری که درصد بازدارندگی آن با پنیر تولیدی از استارتر پنیر تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

جدول ۳- درصد بازدارندگی قطعات پنیر تولیدی بر علیه رشد کپک *Aspergillus flavus*

هفته	باکتری						
	L.pentosus H39	*L.plantarum KU13*	*L.plantarum NBRC107151*	*L.casei D31*	*L.plantarum CAG23*	*L.plantarum PIN*	استارتر
۰	۷/۶۷ ±۰/۰۲^{Ac}	۸/۶۸ ± ۱/۵۹^{Abc}	۱۰/۶۱ ± ۱/۴۰^{Ab}	۲/۴۰ ± ۰/۱۴^{Bd}	۱۳/۰۵ ± ۰/۹۲^{Aa}	۱۴/۸۶ ± ۰/۴۶^{ABa}	۲/۰۸ ± ۰/۹۲^{Ad}
۲	۶/۶۸ ± ۰/۵۵^{Ac}	۱۰/۰۵ ± ۱/۴۹^{Ab}	۹/۷۶ ± ۱/۵۵^{Ab}	۳/۸۷ ± ۰/۱۴^{Acd}	۱۲/۰۷ ± ۱/۴۸^{Aab}	۱۳/۵۵ ± ۱/۸۱^{ABa}	۱/۷۲ ± ۰/۵۸^{Ad}
۴	۷/۸۳ ± ۱/۷۳^{Ab}	۱۱/۱۶ ± ۱/۰۵^{Ab}	۹/۷۲ ± ۱/۷۳^{Ab}	۱/۸۸ ± ۰/۶۸^{BCc}	۱۱/۶۳ ± ۱/۸۳^{Ab}	۱۵/۴۰ ± ۱/۱۲^{Aa}	۲/۶۴ ± ۰/۵۲^{Ac}
۶	۸/۷۴ ± ۱/۳۹^{Aa}	۹/۴۰ ± ۰/۲۰^{Aa}	۹/۱۷ ± ۱/۹۰^{Aa}	۱/۱۱ ± ۰/۰۷^{Cb}	۱۰/۷۵ ± ۱/۵۲^{Aa}	۱۲/۱۴ ± ۱/۷۶^{ABa}	−۱/۶۴ ± ۰/۴۸^{Bb}
۸	۸/۴۱ ± ۱/۷۵^{Aa}	۸/۷۹ ± ۰/۶۱^{Aa}	۹/۴۷ ± ۰/۱۶^{Aa}	−۱/۲۴ ± ۰/۰۹^{Db}	۱۰/۹۵ ± ۱/۰۲^{Aa}	۱۰/۹۴ ± ۱/۳۳^{Ba}	−۳/۷۴ ± ۰/۰۲^{Cb}

- حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف است (P<۰/۰۵)

جدول ۴- درصد بازدارندگی قطعات پنیر تولیدی بر علیه رشد کپک *Aspergillus parasiticus*

هفته	باکتری						
	L.pentosus H39	*L.plantarum KU13*	*L.plantarum NBRC107151*	*L.casei D31*	*L.plantarum CAG23*	*L.plantarum PIN*	استارتر
۰	۱۰/۴۰ ±۱/۵۳^{Aa}	۷/۵۷ ± ۱/۲۴^{Aa}	۸/۸۰ ± ۰/۴۵^{Aa}	−۰/۰۵ ± ۰/۳۲^{Ab}	۱۰/۹۶ ± ۱/۰۰^{Aa}	۱۱/۲۰ ± ۱/۹۴^{Aa}	−۱/۶۶ ± ۰/۴۳^{Ab}
۲	۷/۷۲ ± ۰/۷۹^{Aab}	۸/۲۳ ± ۱/۸۵^{Aab}	۵/۸۵ ± ۰/۴۳^{Ab}	۱/۸۴ ± ۰/۵۱^{Ac}	۹/۹۸ ± ۱/۹۶^{Aa}	۱۰/۳۸ ± ۱/۳۷^{Aa}	−۴/۲۶ ± ۰/۴۵^{Bd}
۴	۸/۹۲ ± ۱/۲۷^{Aab}	۶/۹۱ ± ۱/۶۱^{Ab}	۷/۸۲ ± ۰/۶۹^{Aab}	۰/۴۶ ± ۰/۰۵^{Ac}	۸/۵۰ ± ۰/۷۵^{Aab}	۱۰/۴۵ ± ۱/۲۸^{Aa}	−۲/۲۶ ± ۰/۹۰^{Ad}
۶	۷/۲۶ ± ۰/۸۰^{Abc}	۶/۷۶ ± ۰/۲۳^{Abc}	۵/۶۳ ± ۰/۵۲^{Ac}	۰/۷۸ ± ۰/۱۸^{Ad}	۷/۹۶ ± ۰/۳۰^{Ab}	۹/۸۱ ± ۱/۳۲^{Aa}	−۴/۰۴ ± ۰/۲۱^{Be}
۸	۷/۲۶ ± ۱/۱۷^{Aa}	۷/۰۶ ± ۰/۷۹^{Aa}	۶/۱۵ ± ۰/۴۷^{Aa}	۲/۰۹ ± ۰/۵۹^{Ab}	۸/۶۸ ± ۰/۸۴^{Aa}	۸/۹۷ ± ۰/۲۸^{Aa}	−۳/۸۹ ± ۰/۱۴^{Bc}

- حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف است (P<۰/۰۵)

Archive of SID
www.SID.ir

رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر

نتایج این آزمون به صورت تعداد روز لازم جهت رشد کپک در جداول ۵ و ۶ آمده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود در تمام دماهای آزمایش و در مورد هر دو کپک، همه نمونه‌ها به جز نمونه پنیر تولیدی با باکتری *L. plantarum* KU13 توانستند نسبت به نمونه تولیدی با استارتر پنیر، ایجاد کپک را در سطح پنیر به تعویق بیاندازند. باکتری‌های *L. plantarum* PIN و *L. plantarum* CAG23 بیشترین بازدارندگی را بر علیه رشد کپک‌ها بر سطح پنیر داشتند.

جدول ۵- تعداد روز لازم جهت رشد کپک *Aspergillus flavus* در سطح پنیر

هفته	باکتری						
	L.pentosus H39	*L.plantarum KU13*	*L.plantarum NBRC107151*	*L.casei D31*	*L.plantarum CAG23*	*L.plantarum PIN*	استارتر
۴	۶۱/۳۳ ± ۲/۵۱^{c}	۴۶/۰۰ ± ۱/۰۰^{e}	۶۲/۶۶ ± ۲/۰۸^{c}	۵۳/۳۳ ± ۳/۰۵^{d}	۶۷/۰۰ ± ۲/۰۰^{b}	۷۳/۰۰ ± ۲/۰۰^{a}	۵۱/۳۳ ± ۲/۰۸^{e}
۱۵	۳۰/۳۳ ± ۰/۵۷^{b}	۲۱/۰۰ ± ۱/۰۰^{d}	۳۲/۳۳ ± ۰/۵۷^{b}	۲۶/۰۰ ± ۱/۰۰^{c}	۳۲/۶۶ ± ۱/۵۲^{a}	۳۳/۶۶ ± ۱/۱۵^{a}	۲۵/۰۰ ± ۱/۰۰^{d}
۳۰	۱۰/۳۳ ± ۱/۵۲^{a}	۴/۰۰ ± ۰/۰۰^{c}	۱۰/۶۶ ± ۰/۵۷^{a}	۸/۳۳ ± ۰/۵۷^{b}	۱۱/۳۳ ± ۰/۵۷^{a}	۱۱/۶۶ ± ۱/۱۵^{a}	۵/۳۳ ± ۰/۵۷^{c}

- حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف است ($P<۰/۰۵$).

جدول ۶ - تعداد روز لازم جهت رشد کپک *Aspergillus parasiticus* در سطح پنیر

هفته	باکتری						
	L.pentosus H39	*L.plantarum KU13*	*L.plantarum NBRC107151*	*L.casei D31*	*L.plantarum CAG23*	*L.plantarum PIN*	استارتر
۴	۵۵/۰۰ ± ۲/۰۰^{c}	۴۴/۳۳ ± ۱/۵۲^{e}	۵۸/۰۰ ± ۲/۰۰^{c}	۵۳/۳۳ ± ۲/۰۶^{d}	۶۱/۶۶ ± ۲/۰۸^{b}	۶۵/۶۶ ± ۲/۰۸^{a}	۴۷/۰۰ ± ۲/۰۰^{a}
۱۵	۲۴/۳۳ ± ۰/۵۷^{b}	۱۹/۰۰ ± ۰/۰۰^{e}	۲۴/۶۶ ± ۰/۵۷^{b}	۲۱/۳۳ ± ۰/۵۷^{c}	۲۵/۶۶ ± ۰/۵۷^{a}	۲۶/۳۳ ± ۰/۵۷^{a}	۲۰/۳۳ ± ۰/۵۷^{d}
۳۰	۱۵/۰۰ ± ۰/۰۰^{b}	۵/۶۶ ± ۰/۵۷^{d}	۱۵/۶۶ ± ۱/۵۲^{b}	۹/۶۶ ± ۰/۵۷^{c}	۱۷/۳۳ ± ۰/۵۷^{a}	۱۷/۶۶ ± ۱/۵۲^{a}	۶/۶۶ ± ۰/۵۷^{d}

- حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف است ($P<۰/۰۵$).

نتایج همبستگی داده‌های حاصل از آزمون‌های مختلف

همان‌گونه که در جداول ۷ و ۸ ملاحظه می‌شود، در مورد هر دو کپک مورد آزمایش، بین نتایج آزمون overlay قطعات پنیر و رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد و این دو آزمون با آزمون Microdilution همبستگی معنی‌داری ندارند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۷- نتایج همبستگی آزمون های انجام شده بر علیه کپک *Aspergillus flavus*

	Overlay	Microdilution	رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر (دمای درجه سلسیوس) ۴	رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر (دمای ۱۵ درجه سلسیوس)	رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر (دمای درجه سلسیوس) ۳۰
Overlay	۱				
Microdilution	−۰/۱۱۵ ns	۱			
رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر (دمای ۴ درجه سلسیوس)	۰/۷۶۳ **	۰/۱۳۱ ns	۱		
رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر (دمای ۱۵ درجه سلسیوس)	۰/۶۶۲ **	۰/۰۶۶ ns	۰/۹۱۴ **	۱	
رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر (دمای ۳۰ درجه سلسیوس)	۰/۵۹۸ **	۰/۱۲۹ ns	۰/۹۰۰ **	۰/۹۹۳ **	۱

** معنی‌داری ضرایب همبستگی در سطح ۰/۰۵
ns عدم معنی‌داری در سطح ۰/۰۵

جدول ۸- نتایج همبستگی آزمون های انجام شده بر علیه کپک *Aspergillus parasiticus*

	Overlay	Microdilution	رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر (دمای ۴ درجه سلسیوس)	رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر (دمای ۱۵ درجه سلسیوس)	رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر (دمای ۳۰ درجه سلسیوس)
Overlay	۱				
Microdilution	−۰/۱۱ ns	۱			
رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر (دمای ۴ درجه سلسیوس)	۰/۶۲۹ **	۰/۱۴۴ ns	۱		
رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر (دمای ۱۵ درجه سلسیوس)	۰/۶۹۲ **	۰/۰۵۶ ns	۰/۹۲۸ **	۱	
رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر (دمای ۳۰ درجه سلسیوس)	۰/۷۱۷ **	۰/۱۲۲ ns	۰/۹۴۱ **	۰/۹۷۷۶ **	۱

** معنی‌داری ضرایب همبستگی در سطح ۰/۰۵
ns عدم معنی‌داری در سطح ۰/۰۵

Archive of SID

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌گونه که از نتایج مشخص است، باکتری‌های مورد آزمایش توانستند به صورت معنی‌داری در مقایسه با استارتر صنعتی تولید پنیر، رشد کپک‌ها را به تعویق بیاندازد. این مورد نشان از توانایی قابل قبول این باکتری‌ها در کنترل رشد کپک است و می‌توان از آن‌ها به عنوان نگه‌دارنده‌های بیولوژیکی در پنیر استفاده کرد که این مورد به لحاظ اقتصادی و بهداشتی حائز اهمیت است.

در سال ۲۰۱۱، محی‌الدین و همکاران اثر مهارکنندگی باکتری‌های *L. fermentum* Te007، *L. pentosus* G004، *L. paracasei* D5 و *P. pentosaceus* Te010 را برعلیه کپک‌های *A. niger* و *A. oryzae* در پنیر فرآوری شده نشان دادند. پنیرهای بدون باکتری‌های مورد آزمایش ماندگاری ۴ تا ۶ روز را در ۳۰ درجه سلسیوس نشان دادند و نمونه‌های تولیدی توسط باکتری‌های مورد آزمایش از ۶ تا ۹ روز رشد کپک را به تأخیر انداختند. در حالی که باکتری‌های مورد آزمایش در این تحقیق نتایج بسیار بهتری را نسبت به تحقیق فوق نشان دادند زیرا باکتری‌های موثر در این آزمون توانستند رشد *A. flavus* را ۱۰ تا ۱۱ روز و کپک *A. parasiticus* را ۱۵ تا ۱۷ روز به تأخیر انداختند. لازم به توضیح است که در هر دو تحقیق نمونه‌های تولیدی بدون حضور باکتری‌های دارای خواص ضدقارچی نتایج مشابهی را از خود نشان دادند.

آزمون Overlay قطعات پنیر توانست به خوبی تفاوت بین نمونه‌های تولیدی را در مهار رشد کپک نشان دهد. این آزمون در تحقیقی برای نشان دادن اثر کشندگی *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 بر علیه لیستریا در پنیر استفاده شده است (*et al.*, 2002 Sarantinopoulos).

آزمون Microdilution نیز همانند دو آزمون دیگر تفاوت بین پنیرهای تولیدی از باکتری‌های مورد آزمایش و استارتر صنعتی را نشان داد. این مورد نشان می‌دهد که از این آزمون می‌توان جهت نشان دادن اثر ضدقارچی باکتری‌های دارای خاصیت ضدقارچی در پنیر استفاده نمود. در این آزمون‌ها، نتایج دو آزمون Overlay قطعات پنیر و رشد مستقیم کپک بر سطح پنیر همبستگی مثبت و معنی‌داری با هم دارند. این مورد نشان دهنده یکسان بودن عامل محافظت‌کنندگی از رشد در این دو آزمون می‌باشد که شامل بر هم کنشی از حضور باکتری و مواد ضدقارچی تولید شده از باکتری است نتایج آزمون Microdilution با دو آزمون دیگر همبستگی معنی‌داری ندارند. چرا که در هر کدام از آزمون‌های انجام شده، عاملی که موجب جلوگیری از رشد کپک می‌شود متفاوت است. در آزمون Microdilution از عصاره بدون سلول پنیرهای تولیدی استفاده شد و بنابراین عامل ضدکپکی در این آزمون تنها مواد ضدقارچی تولیدی در پنیرها است و خود سلول باکتری مولد اسیدلاکتیک در این آزمون نقشی ندارد. در دو آزمون دیگر به دلیل استفاده از خود پنیر، هم سلول باکتری و هم مواد ضدقارچی در آزمون نقش دارند. بنابراین می‌توان گفت تفاوت نتایج این آزمون‌ها به این دلیل می‌باشد. از این مورد می‌توان نتیجه گرفت که با آزمون Microdilution عصاره‌های پنیر می‌توان توانایی باکتری‌های مورد آزمایش را در تولید مواد ضدقارچی در محیط پنیر بررسی کرد و از دو آزمون دیگر می‌توان

www.SID.ir

توانایی کلی این باکتری‌ها را در به تعویق انداختن رشد کپک در پنیر مورد بررسی قرار داد.

به عنوان مثال باکتری *L. casei* D31 در آزمون‌های overlay قطعات پنیر و میزان کپک زدگی سطح پنیر عملکرد خوبی در مهار رشد کپک نشان نداد و حتی در آزمون overlay قطعات پنیر تفاوت معنی‌داری با پنیر تولیدی با استارتر پنیر نداشت، اما در آزمون Microdilution دارای کمترین مساحت سطح زیر منحنی بوده و بهترین اثر ضدکپکی را نشان داد. که می‌توان نتیجه گرفت این باکتری می‌تواند مواد ضدکپکی قابل توجهی تولید نماید اما خود سلول اثر آنتاگونستی زیادی بر رشد کپک ندارد. البته به دلیل نزدیک بودن شرایط دو آزمون Overlay قطعات پنیر و میزان کپک‌زدگی سطح پنیر به شرایط کلی حاکم بر رشد کپک بر روی پنیر حین نگه‌داری، از نتایج این دو آزمون می‌توان جهت ارزیابی توانایی واقعی این باکتری‌ها بر علیه رشد کپک در پنیر استفاده نمود و نتایج این دو آزمون بهتر می‌تواند توانایی باکتری‌های مورد آزمایش را در پنیر نشان دهد.

آزمون Microdilution و در کل سنجش میزان OD و ارتباط دادن آن به میزان رشد میکروارگانیسم‌ها، تاکنون در پژوهش‌های مرتبط با باکتری‌ها انجام شده است و در مورد کپک‌ها به دلیل پیچیدگی‌های رشد آن‌ها، تولید میسلیوم از اسپورها و همچنین امکان تولید میسلیوم بدون ایجاد کدورت، استفاده از این آزمون را با ابهام مواجه می‌کند. اگرچه آزمون Microdilution توانست تفاوت بین نمونه‌های تولیدی با باکتری‌های مورد آزمایش و استارتر صنعتی را نشان دهد اما با توجه به موارد ذکر شده این آزمون جهت بررسی خواص ضدکپکی باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک صحیح نمی‌باشد.

در کل با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت برای بررسی اثرات ضدقارچی باکتری‌های مختلف در محیط پنیر می‌توان از آزمون‌های پیشنهاد شده در این تحقیق استفاده نمود. جهت بررسی اثرات ضدقارچی مناسب‌ترین راه رشد مستقیم کپک بر روی محصول غذایی و مقایسه نمونه‌های تولیدی با باکتری‌های مورد آزمایش و نمونه کنترل و بدون اثر ضدقارچی می‌باشد. در این تحقیق نشان داده شد که آزمون Overlay قطعات پنیر همبستگی معنی‌داری با نتایج رشد مستقیم کپک بر روی پنیر دارد بنابراین می‌توان گفت که این آزمون نیز می‌تواند به خوبی اثر ضدقارچی باکتری‌های مورد آزمایش را در پنیر نشان دهد. نتایج آزمون Microdilution عصاره‌های پنیر اگرچه همبستگی معنی‌داری با دو آزمون دیگر نشان ندادند، اما توانست بین نمونه‌های تولیدی با باکتری‌های مورد آزمایش و استارتر صنعتی تفاوت معنی‌داری نشان دهد. علی‌رغم این موضوع به دلیل اینکه نمی‌توان OD را سنجشی برای رشد کپک دانست، استفاده از این آزمون در این مورد توصیه نمی‌شود.

منابع

- Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E. (2007). Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, 1: 475-486.

Archive of SID
www.SID.ir

- Arendt, E.K., Ryan, L.A. and Dal Bello, F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. Food Microbiology, 24(2): 165-174.
- Bhat, R., Rai, R.V. and Karim, A.A. (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9(1): 57-81.
- Caplice, E., and Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology, 50(1): 131-149.
- Carr, F.J., Chill, D. and Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. Critical Reviews in Microbiology, 28(4): 281-370.
- Davidson, P.M., Taylor, T.M., Doyle, M.P. and Beuchat, L.R. (2007). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. Food Microbiology: Fundamentals and frontiers, (Edn. 3): 713-745.
- Gorris, L.G. (2005). Food safety objective: an integral part of food chain management. Food Control, 16(9): 801-809.
- Gourama, H. and Bullerman, L.B. (1995). Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by Lactobacillus species. Journal of Food Protection, 58(11): 1249-1256.
- Guldfeldt, L.U., Sorensen, K.I., Stroman, P., Behrndt, H., Williams, D. and Johansen, E. (2001). Effect of starter cultures with a genetically modified peptidolytic or lytic system on Cheddar cheese ripening. International dairy journal, 11(4): 373-382.
- Gourama, H. and Bullerman, L.B. (1997). Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. International Journal of Food Microbiology, 34(2): 131-143.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C. and Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. Food microbiology, 26(2): 142-150.
- Hammes, W.P., Bantleon, A. and Min, S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. FEMS Microbiology Letters, 87(1): 165-173.
- Jafarpour, D. (2011). Isolation and identification of antifungal lactic acid bacteria from natural sources. M.Sc thesis. Shiraz University.
- Lynch, K.M., Pawlowska, A.M., Brosnan, B., Coffey, A., Zannini, E., Furey, A., *et al.* (2014). Application of *Lactobacillus amylovorus* as an antifungal adjunct to extend the shelf-life of Cheddar cheese. International Dairy Journal, 34(1): 167-173.
- Magnusson, J., Strom, K., Roos, S., Sjogren, J. and Schnurer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters, 219(1): 129-135.
- Muhialdin, B.J., Hassan, Z. and Sadon, S.K. (2011). Antifungal activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Pediococcus pentosaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004, and *L. paracasei* D5 on selected foods. Journal of Food Science, 76: 493–499.
- Nielsen, P.V., Boer, E.D., Samson, R.A., Hoekstra, E.S. and Frisvad, J.C. (2004). Food preservatives against fungi. Introduction to Food-and Airborne Fungi, 7: 357-363.
- Paul Ross, R., Morgan, S. and Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. International Journal of Food Microbiology, 79(1): 3-16.
- Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M.D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., *et al*. (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(1): 125-136.
- Sensidoni, A., Rondinini, G., Peressini, D., Maifreni, M. and Bortolomeazzi, R. (1994). Presence of an off-flavour associated with the use of sorbates in cheese and margarine. Italian Journal of Food Science, 6.
- Settanni, L., Franciosi, E., Cavazza, A., Cocconcelli, P.S. and Poznanski, E. (2011). "Extension of Tosela cheese shelf-life using non-starter lactic acid bacteria". Food Microbiology, 28: 883-890.
- Sjogren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnurer, J. and Kenne, L. (2003). Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14.Applied and Environmental Microbiology, 69(12): 7554-

www.SID.ir

7557.
- Speranza, B., Sinigaglia, M. and Corbo, M.R. (2009). Non starter lactic acid bacteria biofilms: A means to control the growth of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. Food Control, 20(11): 1063-1067.
- Tiina, M. and Sandholm, M. (1989). Antibacterial effect of the glucose oxidase-glucose system on food-poisoning organisms. International journal of Food Microbiology, 8(2): 165-174.
- Paleologos, E.K., Savvaidis, I.N. and Kontominas, M.G. (2004). Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass. Food Microbiology, 21(5): 549-557.
- Pruessner, J.C., Kirschbaum, C., Meinlschmid, G. and Hellhammer, D.H. (2003). Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. Psychoneuroendocrinology, 28(7): 916-931.
- Viljoen, B.C. (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. International Journal of Food Microbiology, 69(1): 37-44.

Archive of SID

www.SID.ir

Introduction and comparison of measurement methods of antifungal properties of lactic acid bacteria in cheese

Sedaghat, H.[1], Eskandari, M.H.[2*], Moosavi-Nasab, M.[3], Shekarforoush, S.S.[4], Hanifpour, M.A.[5]

1- Former M.Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
3- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
4- Professor, Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
5- Industrial consultant, Pegah Fars Dairy Co. Shiraz, Iran.
*Corresponding author email: eskandar@shirazu.ac.ir
(Received: 2013/12/24 Accepted: 2014/5/24)

Archive of SID

Abstract

Various laboratory methods have been developed to evaluate the effectiveness of anti-mould effect of lactic acid bacteria. However, most of these investigations have been conducted in culture medium. Due to the occurrence of complex interaction between food components and antimicrobial substances produced by lactic acid bacteria, the result achieved from these studies may be different from those seen in food model. In various studies growth inhibition of molds on the surface of foods are considered as antifungal activity. Consequently, introduction and comparison of efficient methods for evaluation of anti-mould effect of lactic acid bacteria would be helpful. In this study, antifungal activity of lactic acid bacteria inoculated in cheese was estimated using Microdilution method. Pieces of cheese samples were overlaid with molds and the antifungal effect of this bacteria was studied against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. All three methods showed the effectiveness of lactic bacteria on mold inhibition. Comparison of the results showed that there was significant positive correlation between antifungal overlay assay and direct growth of mold on cheese, since this two test showed antifungal effect in the same way including interaction between bacteria and mold and also producing antifungal compound.

Key words: Lactic acid bacteria, Cheese, Antifungal, Microdilution test, Overlay test

www.SID.ir