



10.30495/JFH.2020.671113

«مقاله پژوهشی»

## اثر باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر بقای استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولای در پنیر لاکتیکی و ویژگی‌های کیفی آن

راحله فرهی آشتیانی<sup>۱</sup>، سیدشهرام شکر فروش<sup>۲\*</sup>، حمیدرضا قیصری<sup>۳</sup>، سارا بصیری<sup>۴</sup>، محمدهادی اسکندری<sup>۵</sup>

۱. دانش‌آموخته دکترای بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۲. استاد بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۳. دانشیار بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۴. استادیار بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۵. دانشیار صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات\*: shekar@shirazu.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۸/۸/۱۲ پذیرش نهایی: ۹۸/۱۱/۱۴)

### چکیده

برخی از پروبیوتیک‌ها علاوه بر تعادل فلور میکروبی روده میزبان، می‌توانند از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در غذا جلوگیری کنند. در این تحقیق ویژگی‌های کیفی و قابلیت زنده‌مانی دو میکروارگانیسم بیماری‌زای استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولای در پنیر لاکتیکی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور در مرحله اول چهار نوع پنیر لاکتیکی (۶۰ نمونه) پروبیوتیک (حاوی لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) و غیر پروبیوتیک تهیه شده با شیر حاوی ۳ و ۴/۵ درصد چربی در سه تکرار تهیه و در زمان‌های صفر، ۱۴، ۲۸، ۴۲ و ۵۶ مورد ارزیابی کیفی قرار گرفت. سپس، ۱۲ نوع پنیر لاکتیکی (پروبیوتیک/ غیر پروبیوتیک) درصد چربی (۳ و ۴/۵ درصد) و میکروارگانیسم بیماری‌زا (عدم حضور، حضور استافیلوکوکوس اورئوس یا اشریشیا کلی) (۱۸۰ نمونه) تهیه و زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در حضور پروبیوتیک در روزهای صفر، ۷، ۱۴، ۲۸ و ۳۵ مورد ارزیابی قرار گرفت. افزودن پروبیوتیک‌ها به پنیر لاکتیکی، اکسیداسیون اسیدهای چرب را به‌طور معنی‌داری کاهش داده و اسیدیته و درصد ترکیبات ازته فرار را افزایش داد ( $P < 0/05$ ). افزودن پروبیوتیک در پنیرهای با درصد چربی بالا، سبب افزایش ترکیبات ازته غیر پروتئینه شد ولی در پنیرهای کم‌چرب، این شاخص کاهش یافت. افزودن پروبیوتیک به پنیر لاکتیکی رشد استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولای را به‌طور معنی‌دار کاهش داد ( $P < 0/05$ ). افزایش درصد چربی، تأثیر معنی‌دار در مهار رشد باکتری توسط پروبیوتیک‌ها نشان نداد. با توجه به اثرات مفید افزودن پروبیوتیک‌ها بر کاهش روند رشد باکتری‌های بیماری‌زا و عدم تغییر معنی‌دار در ویژگی‌های حسی پنیر لاکتیکی، استفاده از این پروبیوتیک‌ها در تولید پنیر لاکتیکی کم‌چرب، توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پنیر لاکتیکی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کولای

## مقدمه

آب‌اکسیژنه توسط باکتری‌های آغازگر اشاره کرد (Lankaputhra and Shah, 1998).

پنیر، محصولی غنی از پروتئین و اسیدهای آمینه ضروری است. علیرغم وجود تنوع در ویژگی‌های انواع مختلف پنیر، عمده پنیرهای تولیدی به دلیل دارا بودن pH بالاتر، ظرفیت بافری، چربی بالا، کم‌تر بودن اسیدیته قابل تیتراسیون و پتانسیل اکسیداسیون-احیا و بافت متراکم و منسجم، در مقایسه با سایر محصولات شیری تخمیری از قبیل ماست و شیرهای اسیدی، غذای حامل مناسب‌تری برای پروبیوتیک‌ها بوده و شرایط جهت ماندگاری و حفظ فعالیت زیستی آن‌ها را طی عبور از دستگاه گوارش و هضم فراهم می‌سازند می‌باشند (Karimi et al., 2011; Ghaemi et al., 2012; Karimi et al., 2012).

پنیر، در برابر محیط اسیدی دستگاه گوارش از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک محافظت کرده و بر این اساس، محیط مطلوبی برای بقای آن‌ها در سراسر دستگاه گوارش ایجاد می‌نماید (Ross et al., 2002; Bergamin et al., 2005).

فرآیند رسیدن پنیر بسیار پیچیده است. تغییرات میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی ایجادشده در لخته، به تغییراتی در عطر و طعم و ویژگی‌های بافتی محصول منجر می‌شوند. دوره رسیدن، یک چالش اضافی در فرآیند تولید پنیر پروبیوتیک است، چرا که به دلیل اثرات متقابل میکروارگانیسم‌های استراتر و پروبیوتیک‌ها، پیش‌بینی تعداد دقیق پروبیوتیک‌های زنده در انتهای دوره رسیدن، دشوار است تغییرات بیوشیمیایی طی دوره رسیدن، با کاهش pH پنیر همراه هستند که ممکن است شرایط را برای برخی از

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف در مقادیر کافی، دارای اثرات مفیدی از جمله بهبود تعادل میکروفلور دستگاه گوارش، تحریک سیستم ایمنی و فعالیت ضد سرطانی، درمان عدم تحمل لاکتوز، درمان سندروم روده تحریک‌پذیر، پیشگیری و درمان اسهال می‌باشند (Talwalkar et al., 2004). غذاهای پروبیوتیک سلامت‌بخش، محصولی عمل‌آوری شده حاوی مقادیر کافی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک زنده ( $10^6$ – $10^7$  CFU/g) می‌باشند (Saxelin et al., 2003; Khosrowshahi et al., 2006). فعالیت متابولیک باکتری‌های پروبیوتیک در تمامی مراحل تولید، نگهداری و هضم ماده غذایی در دستگاه گوارش مصرف‌کننده باید حفظ گردد. تاکنون مطالعات زیادی به‌منظور استفاده از پروبیوتیک‌ها در فرآورده‌های مختلف شیری از جمله شیر تخمیری (Rosenthal and Bernstein, 1998)، ماست (Rybka and Kailasapathy, 1995)، پنیر نرم فرسکو (Vinderola et al., 2000)، پنیر کرسنزا (Ghodussi and Robinson, 1996).

پنیر چدار (Daigle et al., 1999)، پنیر سخت (Corbo et al., 2001)، پنیر شیر بز (Gomes and Malcata, 1998)، پنیر تازه (Buriti et al., 2005)، پنیر سفید (Kasimoglu et al., 2004)، دوغ کره تخمیری (Dinakar and Mistry, 1994) و بستنی (Hekmat and McMahon, 1992) صورت گرفته است. حفظ و بقای باکتری‌های پروبیوتیکی در این محصولات با چالش‌های متعددی روبرو است که از آن جمله می‌توان به pH پایین، شرایط هوازی تولید، بسته‌بندی و تولید

سایر میکروارگانیسم بیماری‌زای غذایی صورت گرفته است (Akineden et al., 2008; Charlier et al., 2009). رقابت تغذیه‌ای، تولید باکتریوسین، پراکسید هیدروژن و اسیدهای آلی و کاهش pH، از مکانیسم‌های احتمالی ضد میکروبی لاکتوباسیل‌ها علیه میکروارگانیسم بیماری‌زای غذایی ذکر شده‌اند (Kazemi et al., 2012).

پنیر به‌عنوان ترکیب غذایی با ارزش تغذیه‌ای و سرانه مصرف بالا، می‌تواند زمینه‌ای مناسب برای افزودن باکتری‌های مفید پروبیوتیک باشد. پنیر تازه لاکتیکی، پنیری بدون دوره رسیدن، با بافتی نیمه سخت و عطر و طعمی مطلوب و بازارپسندی بالاست. در مطالعه حاضر به بررسی اثر افزودن باکتری‌های پروبیوتیک، بر کیفیت و ویژگی‌های حسی پنیر لاکتیکی و نقش آن بر زنده‌مانی باکتری‌های بیماری‌زای استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولای پرداخته شده است.

## مواد و روش‌ها

### - مواد مصرفی

شیر تازه پاستوریزه (چربی ۳ درصد، پروتئین ۳/۰۶ درصد، ماده خشک بدون چربی ۸/۶۱ درصد، اسیدیته ۱۴/۵۱ درجه دورنیک و pH= ۶/۷) و ماست با اسیدیته ۱۴۰ درجه دورنیک از شرکت فرآورده‌های لبنی وارنا تهیه گردید. پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) و لاکتوباسیلوس کازئی (*L. casei*) 431 لیوفیلیزه از شرکت کریستین هانسن دانمارک تهیه شد. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 6538) و اشریشیا کولای (ATCC 35218) مقاوم به نالیدیسیک اسید از آزمایشگاه میکروبیولوژی بهداشت

سویه‌های پروبیوتیک نامناسب سازد (Hayes et al., 2006). از این‌رو، پنیر تازه به علت نداشتن دوره رسیدن، نگهداری در درجه حرارت یخچال و محدود بودن دوره نگهداری، کاندیدای مناسبی برای افزودن باکتری‌های پروبیوتیک محسوب می‌شود (Heller et al., 2003).

البته نباید این نکته را از نظر دور داشت که پروبیوتیک‌ها با افزایش پروتئولیز و تشکیل پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه با جرم مولکولی کم، کمک قابل توجهی به رسیدن پنیر می‌کنند (Gomes and Malcata, 1998).

در تمامی فرآورده‌های تخمیری شیر بقای گونه پروبیوتیک بستگی کامل به جنس پروبیوتیک انتخاب شده دارد (O'Riordan and Fitzgerald, 1998). لاکتوباسیل‌ها یکی از معمول‌ترین پروبیوتیک‌هایی هستند که در فرآورده‌های شیری مورد استفاده قرار می‌گیرند. لاکتوباسیل‌ها در صنعت برای اصلاح بو، طعم و بافت محصولات تخمیری به کار می‌روند و با توجه به اثر ممانعت از رشدی که بر روی باکتری‌های نامطلوب دارند، استفاده از این ارگانیسم‌ها یا باکتریوسین‌های خالص شده آن‌ها به‌عنوان نگه‌دارنده بیولوژیکی در صنعت غذا رو به افزایش است (Sreekumar and Mosono, 2000).

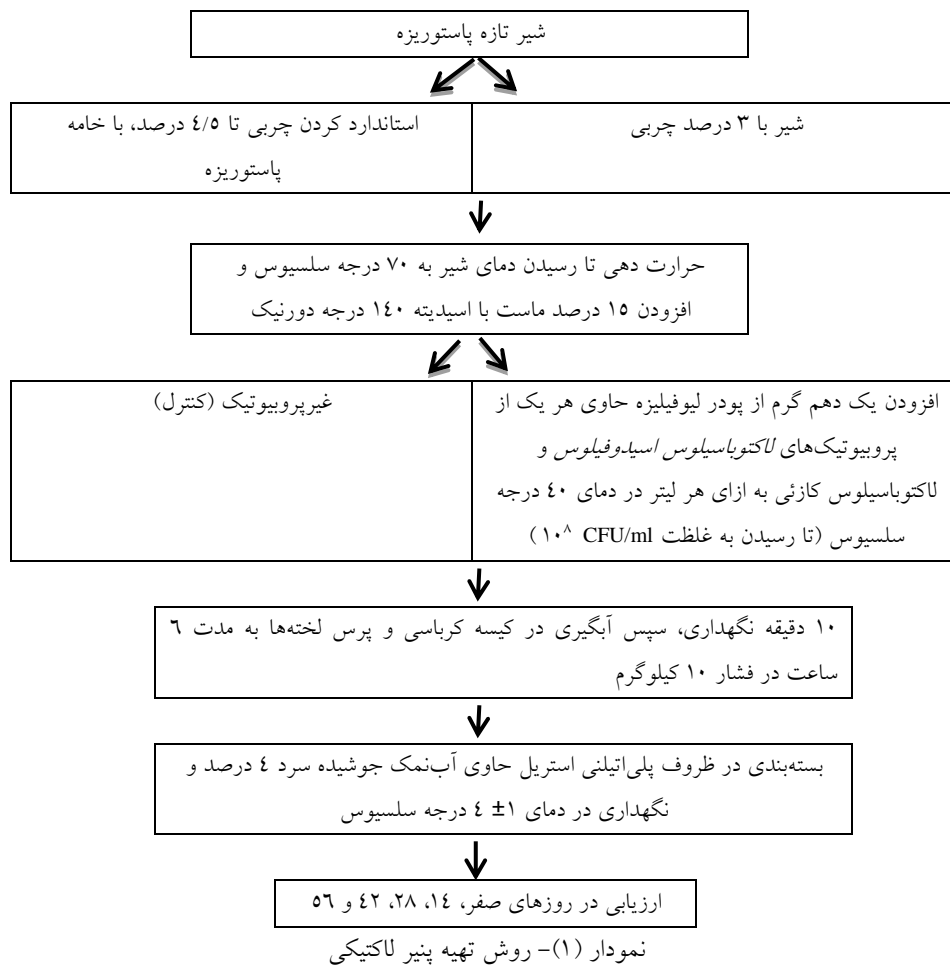
مسمومیت‌های غذایی، از عمده‌ترین بیماری‌های جوامع بشری محسوب می‌شوند. استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولای نقش مهمی در بروز اپیدمی‌های عفونت‌های غذایی دارند. مطالعات مختلفی در ارتباط با تأثیر برخی سویه‌های اسیدلاکتیکی بر رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کولای و

اشریشیا کولای در پنیر لاکتیکی، پنیرها در دو مرحله و طبق روش ذکرشده در نمودار (۱) در شرکت فرآورده‌های شیری وارنا تولید و مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز تهیه گردید.

**- تولید پنیر لاکتیکی**

به منظور ارزیابی کیفیت و بررسی زنده‌مانی میکروارگانسیم بیماری‌زای استافیلوکوکوس اورئوس و



و به آن‌ها  $10^3$  CFU/ml / استافیلوکوکوس اورئوس یا  $10^3$  CFU/ml / اشریشیا کولای مقاوم شده به نالیدیکسیک اسید اضافه شد. به منظور تلقیح باکتری‌های بیماری‌زا، ابتدا کشت ۲۴ ساعته هر یک از باکتری‌ها در محیط تریپتوز سوپا برات تهیه و پس از

- بررسی زنده‌مانی میکروارگانسیم بیماری‌زا در پنیر لاکتیکی پروبیوتیک در مرحله دوم، مجدداً مطابق نمودار (۱) چهار نوع پنیر لاکتیکی شامل پنیر پروبیوتیک و غیر پروبیوتیک تهیه شده با شیر ۳ درصد و ۴/۵ درصد چربی تهیه شد

مالون دی آلدئید در هر کیلوگرم نمونه محاسبه گردید (Alam and Fareed, 2016).

#### - ارزیابی ویژگی‌های میکروبیولوژی

برای آماده‌سازی نمونه ابتدا مقدار ده گرم آن را در شرایط استریل به مقدار ۹۰ میلی‌لیتر نرمال سالیین افزوده و با استوماکر همگن گردید. سپس رقت‌های اعشاری متوالی تهیه شد. شمارش باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی به ترتیب با استفاده از محیط‌های کشت MRS (Merk, Germany) Bile agar-MRS و MRS vancomycin agar (Merk, Germany) و روش پورپلیت انجام شد (Vinderola et al., 2000). جهت شمارش استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولای مقاوم به نالیدیکسیک اسید، به ترتیب از محیط کشت‌های Baird Parker Agar (Merk, Germany) (ISIRI, 6806-1/2005) و مک کانکی آگار (Merk, Germany) حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نالیدیکسیک اسید و روش کشت سطحی استفاده شد (Cirra, Kiiyukia, 2003).

#### - ارزیابی حسی

برای ارزیابی ویژگی‌های حسی (رنگ، بافت، بو و عطر و طعم) نمونه‌های پنیر فاقد میکروارگانیسم بیماری‌زای، از ۱۰ ارزیاب آموزش‌دیده با روش امتیازدهی هدونیک ۹ نقطه‌ای (بسیار بد: ۱ تا بسیار عالی: ۹) استفاده شد. (Meilgaard et al, 2007).

#### - آنالیز آماری

به‌منظور مقایسه شاخص‌های ارزیابی‌شده در تیمارهای مختلف طی دوره نگهداری از آزمون آماری Repeated Measure ANOVA و مقایسه

تعیین غلظت به روش مک‌فارلند، به ازای هر لیتر شیر، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون با غلظت  $10^6$  CFU/ml از هر یک از باکتری‌ها در دمای ۴۰ درجه سلسیوس اضافه شد و در ظروف پلی‌اتیلنی استریل بسته‌بندی و در دمای  $1 \pm 4$  درجه سلسیوس نگهداری شدند. نمونه‌برداری در روزهای صفر، ۷، ۱۴، ۲۸ و ۳۵ انجام شد.

#### - ارزیابی ویژگی‌های شیمیایی

اندازه‌گیری pH توسط دستگاه pH متر و اسیدیته به روش تیتراسیون با سود ۰/۱ نرمال در حضور فنل فتالین مورد انجام شد (ISIRI, 2852/1995). اندازه‌گیری ازت غیر پروتئینی (NPN) مطابق با روش Barbano et al, و همکاران انجام شد (Barbano et al, 1991). اندازه‌گیری بازهای ازته فرار (TVN) با تقطیر به روش کلدال و تیتراسیون با اسیدسولفوریک انجام شد و مقدار TVN (میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه)، با ضرب حجم اسید مصرفی در ۱۴ محاسبه گردید (AOAC, 2005).

جهت اندازه‌گیری تیوباربتوریک اسید (TBARS)،

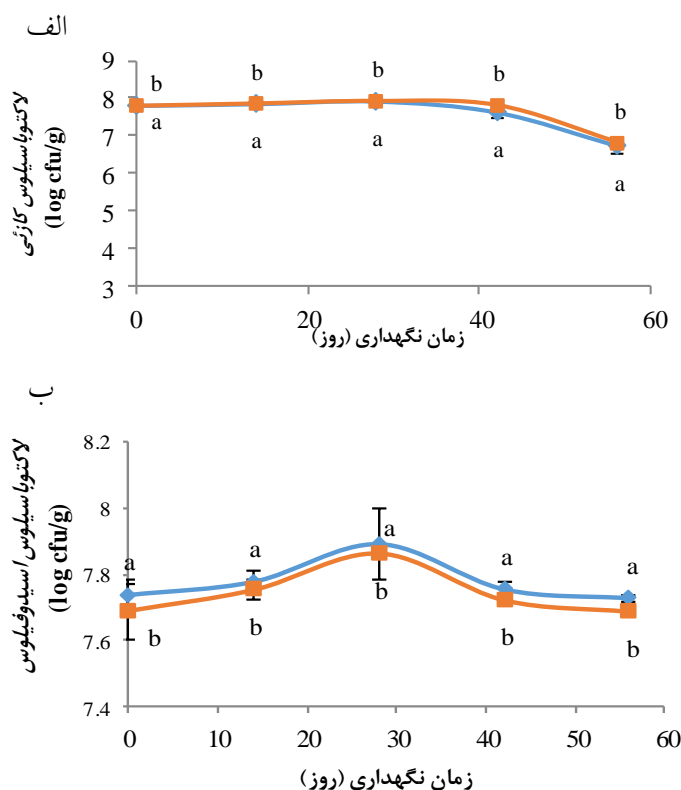
ده گرم از نمونه با ۳۰ میلی‌لیتر اسید پرکلریک ۴ درصد و یک میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد BHT در اتانول هموژنیزه گردید. پس از صاف کردن مخلوط توسط فیلتر کاغذی واتمن شماره ۴، ۵ میلی‌لیتر از محلول صاف‌شده با ۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۲ مولار TBA مخلوط گردید و پس از ۲۰ دقیقه قراردهی در حمام آب جوش و سرد کردن سریع، جذب نوری نمونه در طول موج ۵۳۲ نانومتر در برابر محلول شاهد (فاقد نمونه) قرائت گردید و میزان TBA بر اساس میلی‌گرم

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در مقایسه با لاکتوباسیلوس کازئی آرام‌تر بود و در هر دو نمونه پنیر تهیه‌شده از شیر ۳ و ۴/۵ درصد چربی لگاریتم تعداد باکتری به کمتر از ۷/۷ نرسید و این در حالی است که لگاریتم تعداد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در پنیر کم‌چرب و پرچرب در روز ۵۶ نگهداری به ترتیب به ۶/۸۳ و ۶/۷۳ کاهش یافت.

شاخص‌های ارزیابی‌شده در روزهای مختلف هر تیمار از آزمون آماری One Way ANOVA استفاده شد. برای مقایسه داده‌های حسی از روش آماری غیر پارامتری Kruskal Wallis استفاده شد. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

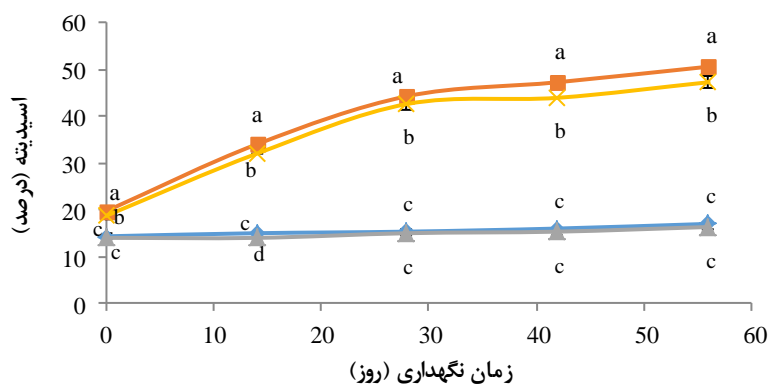
– زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک طی زمان نگهداری طبق نمودار (۲) تعداد دو باکتری پروبیوتیک طی مدت نگهداری کاهش یافت. روند کاهش باکتری



Mmm نمودار (۲)– زنده‌مانی پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی (الف) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (ب) طی ۵۶ روز نگهداری پنیر لاکتیکی در دمای ۴ درجه سلسیوس. پنیر پروبیوتیک تهیه‌شده با شیر ۳ درصد چربی (×) و پنیر پروبیوتیک تهیه‌شده با شیر ۴/۵ درصد چربی (■) (در نمودار ب هر دو نمودار بر هم منطبق می‌باشند).

افزایش معنی داری را در مقایسه با گروه فاقد پروبیوتیک نشان دادند ( $P < 0/05$ ). همچنین نتایج نشان دادند که با افزایش درصد چربی در پنیرهای پروبیوتیک یا غیر پروبیوتیک، میزان اسیدیته طی دوره نگهداری کاهش معنی داری یافت ( $P < 0/05$ ).

**تغییرات اسیدیته نمونه‌های پنیر طی زمان نگهداری**  
تغییرات اسیدیته پنیر پروبیوتیک و غیر پروبیوتیک تهیه شده از شیر ۳ و ۴/۵ درصد چربی طی ۵۶ روز نگهداری در نمودار (۳) نشان داده شده است. همان طور که در نمودار مشاهده می شود، طی دوره نگهداری، میزان اسیدیته قابل تیتراسیون در پنیرهای پروبیوتیک

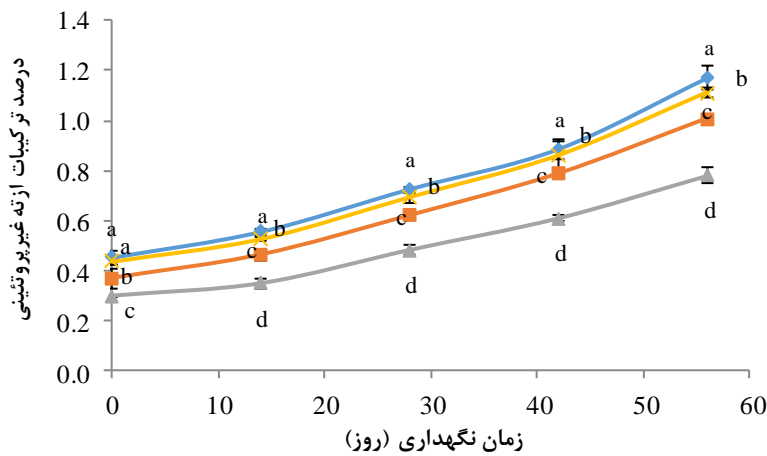


نمودار (۳) - تغییرات اسیدیته در نمونه‌های پنیر غیر پروبیوتیک دارای ۳ درصد چربی (◆)، پنیر پروبیوتیک دارای ۳ درصد چربی (■)، پنیر غیر پروبیوتیک دارای ۴/۵ درصد چربی (▲) و پروبیوتیک دارای ۴/۵ درصد چربی (x) طی زمان نگهداری. a, b, c, d: حروف کوچک غیر مشابه بیانگر تفاوت آماری معنی دار بین هر تیمار در هر روز است ( $P < 0/05$ ).

پنیرهای تهیه شده با شیر ۳ درصد چربی، میزان NPN با افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیوس کازئی، کاهش یافت. در پنیر پروبیوتیک، با افزایش درصد چربی، میزان NPN طی دوره نگهداری افزایش یافت ( $P < 0/05$ ) در حالی که در گروه کنترل (فاقد پروبیوتیک)، با افزایش درصد چربی، میزان NPN کاهش یافت ( $P < 0/05$ ).

**تغییرات TVN، NPN و تیوباریتوریک اسید نمونه‌های پنیر طی زمان نگهداری**

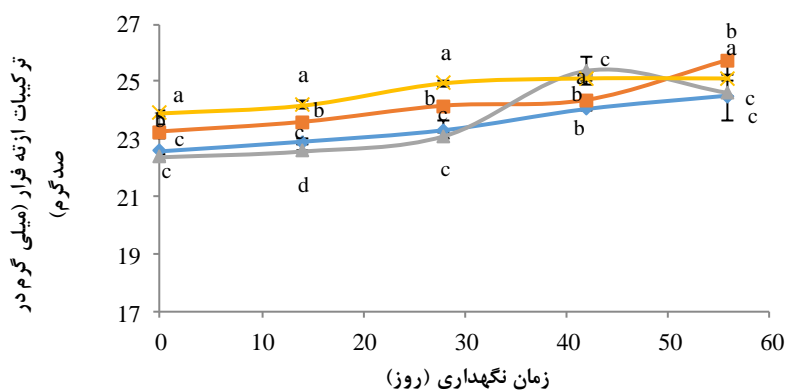
تغییرات میزان ترکیبات از ته غیر پروتئینی (NPN) در پنیرهای پروبیوتیک و غیر پروبیوتیک تهیه شده از شیر ۳ و ۴/۵ درصد چربی طی دوره نگهداری در نمودار (۴) آورده شده است. در همه نمونه‌ها با افزایش زمان نگهداری، میزان NPN افزایش یافت. در پنیرهای تهیه شده با شیر ۴/۵ درصد چربی، افزودن پروبیوتیک سبب افزایش معنی دار درصد NPN شد، در حالی که در



نمودار (۴) - تغییرات درصد ترکیبات ازته غیر پروتئینی (NPN) در نمونه‌های پنیر غیر پروبیوتیک دارای ۳ درصد چربی (◆)، پنیر پروبیوتیک دارای ۳ درصد چربی (■)، پنیر غیر پروبیوتیک دارای ۴/۵ درصد چربی (▲) و پروبیوتیک دارای ۴/۵ درصد چربی (x) طی زمان نگهداری. a, b, c, d: حروف کوچک غیرمشابه بیانگر تفاوت آماری معنی دار بین هر تیمار در هر روز است ( $P < 0/05$ ).

میزان ترکیبات ازته فرار در مقایسه با گروه کنترل شد همچنین در هر دو گروه پروبیوتیک و غیر پروبیوتیک، با افزایش درصد چربی پنیر، میزان ترکیبات ازته فرار به‌طور معنی داری افزایش یافت ( $P < 0/05$ ).

روند تغییرات ترکیبات ازته فرار در نمونه‌های مختلف پنیر در نمودار (۵) آورده شده است. طی دوره نگهداری، میزان ترکیبات ازته فرار افزایش یافت. افزودن پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) سبب افزایش معنی دار در

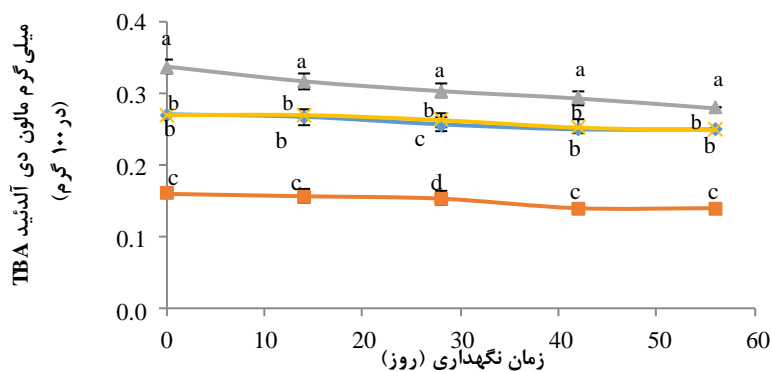


نمودار (۵) - تغییرات میزان ترکیبات ازته فرار (میلی گرم در صد گرم نمونه) در نمونه‌های پنیر غیر پروبیوتیک دارای ۳ درصد چربی (◆)، پنیر پروبیوتیک دارای ۳ درصد چربی (■)، پنیر غیر پروبیوتیک دارای ۴/۵ درصد چربی (▲) و پروبیوتیک دارای ۴/۵ درصد چربی (x) طی زمان نگهداری. a, b, c, d: حروف کوچک غیرمشابه بیانگر تفاوت آماری معنی دار بین هر تیمار در هر روز است ( $P < 0/05$ ).



گردید ( $P < 0/05$ ). در پنیرهای پروبیوتیک و غیرپروبیوتیک، با افزایش درصد چربی، افزایش معنی دار در میزان مالون دی آلدئید مشاهده گردید ( $P < 0/05$ ).

نتایج تأثیر افزودن پروبیوتیک در پنیر لاکتیکی بر اکسیداسیون اسیدهای چرب در نمودار (۶) آورده شده است. افزودن پروبیوتیک موجب کاهش معنی دار در میزان مالون دی آلدئید (میلی گرم در صد گرم) پنیر



نمودار (۶) - تغییرات میزان TBA در نمونه‌های پنیر غیرپروبیوتیک دارای ۳ درصد چربی (◆)، پنیر پروبیوتیک دارای ۳ درصد چربی (■)، پنیر غیرپروبیوتیک دارای ۴/۵ درصد چربی (▲) و پروبیوتیک دارای ۴/۵ درصد چربی (x) طی زمان نگهداری. حروف کوچک غیرمشابه بیانگر تفاوت آماری معنی دار بین هر تیمار در هرروز است ( $P < 0/05$ ).

غلظت چربی، عطر و طعم در پنیرها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0/05$ ). هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در زمان‌های مختلف نگهداری مشاهده نگردیده است.

بررسی نتایج حاصل از تغییرات بو در نمونه‌های مختلف پنیر طی زمان‌های نگهداری نشان می‌دهد که افزودن پروبیوتیک تأثیر معنی‌داری بر بوی پنیر لاکتیکی نداشت. نمونه‌های پنیر کم‌چرب نسبت به نمونه‌های پرچرب امتیاز بالاتری را کسب نمودند ( $P < 0/05$ ). همچنین هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در زمان‌های مختلف نگهداری مشاهده نگردیده است. همچنین نتایج نشان دادند که افزودن پروبیوتیک یا تغییر درصد چربی تغییر معنی‌دار در رنگ پنیر ایجاد نمی‌کند.

#### ارزیابی حسی نمونه‌های پنیر طی دوره نگهداری

نتایج ارزیابی بافت، عطر و طعم، رنگ، بو و ظاهر نمونه‌های پنیر در جدول (۱) آورده شده است. با افزایش دوره نگهداری، سختی در پنیرها روند افزایشی را نشان داد. افزودن پروبیوتیک، سختی بافت را در مقایسه با نمونه‌های کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش داد ( $P < 0/05$ ). در پنیرهای غیرپروبیوتیک، با افزایش درصد چربی، میزان سختی بافت افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ) درحالی‌که در پنیرهای پروبیوتیک، درصد چربی تأثیر معنی‌داری بر سختی بافت نداشت.

افزودن پروبیوتیک به پنیر لاکتیکی تغییر معنی‌داری در عطر و طعم پنیر ایجاد نکرد، درحالی‌که با افزایش

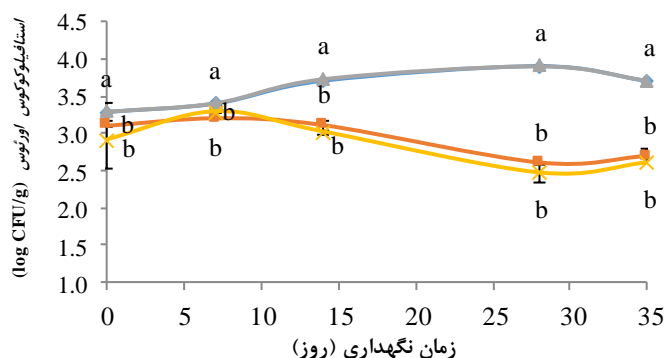
جدول (۱) - تغییرات (Mean ± SD) امتیازات ارزیابی حسی نمونه‌های پنیر طی دوره نگهداری

شاخص حسی	نمونه	زمان نگهداری (روز)			
		۰	۱۴	۲۸	۴۲
بافت	۱	۷/۸۰ ± ۰/۲۰ <sup>a</sup>	۸/۵۳ ± ۰/۵۰ <sup>a</sup>	۸/۷۳ ± ۰/۲۵ <sup>a</sup>	۸/۸۰ ± ۰/۲۰ <sup>a</sup>
	۲	۷/۳۷ ± ۰/۳۵ <sup>b</sup>	۸/۴۰ ± ۰/۱۰ <sup>a</sup>	۸/۵۰ ± ۰/۲۰ <sup>a</sup>	۸/۶۰ ± ۰/۴۰ <sup>a</sup>
	۳	۷/۶۰ ± ۰/۱۰ <sup>a</sup>	۸/۱۷ ± ۰/۰۶ <sup>a</sup>	۸/۶۰ ± ۰/۱۰ <sup>a</sup>	۸/۶۰ ± ۰/۱۰ <sup>a</sup>
	۴	۷/۵۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۷/۹۷ ± ۰/۱۵ <sup>a</sup>	۸/۳۷ ± ۰/۱۵ <sup>a</sup>	۸/۵۰ ± ۰/۱۰ <sup>a</sup>
عطر و طعم	۱	۸/۲۳ ± ۰/۲۵ <sup>a</sup>	۸/۵۰ ± ۰/۵۰ <sup>a</sup>	۸/۶۰ ± ۰/۴۰ <sup>a</sup>	۸/۶۰ ± ۰/۲۰ <sup>a</sup>
	۲	۸/۲۷ ± ۰/۲۵ <sup>a</sup>	۸/۵۷ ± ۰/۴۰ <sup>a</sup>	۸/۷۳ ± ۰/۲۵ <sup>a</sup>	۸/۹۳ ± ۰/۱۱ <sup>ab</sup>
	۳	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۲۰ ± ۰/۳۰ <sup>a</sup>	۸/۴۰ ± ۰/۱۰ <sup>a</sup>	۸/۲۰ ± ۰/۲۰ <sup>a</sup>
	۴	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۲۰ ± ۰/۲۰ <sup>a</sup>	۸/۲۰ ± ۰/۲۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>
رنگ	۱	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>
	۲	۸/۲۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۲۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۲۰ ± ۰/۳۰ <sup>a</sup>	۸/۰۲ ± ۰/۲۰ <sup>a</sup>
	۳	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>
	۴	۸/۵۰ ± ۰/۵۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ ± ۱/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ ± ۱/۰۰ <sup>a</sup>
بو	۱	۷/۵۰ ± ۰/۵۰ <sup>a</sup>	۷/۵۰ ± ۰/۵۰ <sup>a</sup>	۷/۵۰ ± ۰/۵۰ <sup>a</sup>	۷/۲۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>
	۲	۷/۵۰ ± ۰/۵۰ <sup>a</sup>	۷/۵۰ ± ۰/۵۰ <sup>a</sup>	۷/۵۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۷/۴۰ ± ۰/۱۰ <sup>a</sup>
	۳	۷/۸۰ ± ۰/۲۰ <sup>a</sup>	۸/۲۰ ± ۰/۲۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>
	۴	۷/۶۰ ± ۰/۱۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۷/۸۰ ± ۰/۲۰ <sup>a</sup>	۸/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>

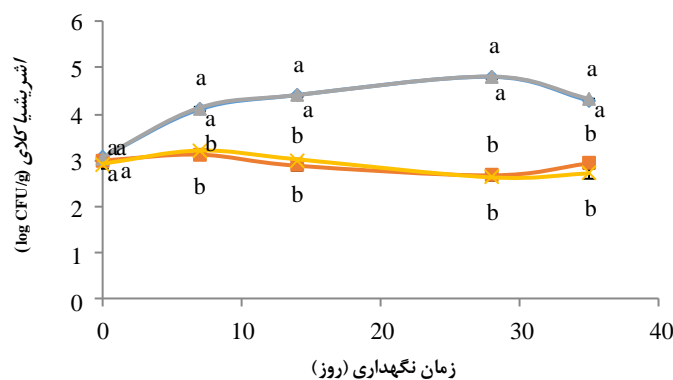
۱: پنیر غیر پروبیوتیک تهیه شده با شیر ۴/۵ درصد چربی، ۲: پنیر پروبیوتیک تهیه شده با شیر ۴/۵ درصد چربی، ۳: پنیر غیر پروبیوتیک تهیه شده با شیر ۳ درصد چربی و ۴: پنیر پروبیوتیک تهیه شده با شیر ۳ درصد چربی. a, b: حروف کوچک نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در هر روز می‌باشد (P < ۰/۰۵).

رشد استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کولای در مقایسه با نمونه کنترل (فاقد پروبیوتیک) طی زمان نگهداری شده است که این اختلاف از نظر آماری معنی دار می‌باشد (P < ۰/۰۵). بر طبق نتایج فوق میزان چربی در پنیر لاکتیکی بر روی شمارش باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کولای تأثیر چندانی ندارد و میزان زنده‌مانی این دو باکتری در پنیرهای تهیه شده با شیر ۳ و ۴/۵ درصد چربی اختلاف معنی‌دار وجود ندارد.

- بررسی بقای ارگانیسم‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کولای در نمونه‌های پنیر  
نتایج زنده‌مانی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کولای در پنیر پروبیوتیک تهیه شده با شیر ۳ و ۴/۵ درصد چربی در مقایسه با گروه کنترل غیر پروبیوتیک طی ۳۵ روز دوره نگهداری به ترتیب در نمودارهای (۷) و (۸) آورده شده است. همان‌گونه که در نمودارها مشخص است، وجود باکتری‌های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی) در پنیر لاکتیکی موجب کاهش



نمودار (۷) - زنده‌مانی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (log cfu/g) در نمونه‌های پنیر غیر پروبیوتیک دارای ۳ درصد چربی (♦)، پنیر پروبیوتیک دارای ۳ درصد چربی (■)، پنیر غیر پروبیوتیک دارای ۴/۵ درصد چربی (▲) و پروبیوتیک دارای ۴/۵ درصد چربی (x) طی زمان نگهداری. a, b: حروف کوچک غیرمشابه بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار در هر روز است ( $P < 0/05$ ).



نمودار (۸) - زنده‌مانی باکتری *اشریشیا کولای* (log cfu/g) در نمونه‌های پنیر غیر پروبیوتیک دارای ۳ درصد چربی (♦)، پنیر پروبیوتیک دارای ۳ درصد چربی (■)، پنیر غیر پروبیوتیک دارای ۴/۵ درصد چربی (▲) و پروبیوتیک دارای ۴/۵ درصد چربی (x) طی زمان نگهداری. a, b: حروف کوچک غیرمشابه بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار در هر روز است ( $P < 0/05$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، مشخص گردید که این نوع پنیر، محیط مناسبی برای این دو پروبیوتیک بوده و تا ۵۶ روز بقای آن‌ها در تعداد کافی و مناسب را تضمین می‌کند. با وجود اندک کاهش در تعداد هر دو نوع پروبیوتیک در طول دوره نگهداری، لگاریتم تعداد پروبیوتیک‌ها در آخرین روز نگهداری، به کمتر از

۶/۷۳ نرسید. وجود شبکه جامد موجود در پنیر می‌تواند در حفظ باکتری‌های پروبیوتیک طی زمان نگهداری مؤثر باشد (Shah, 2000). افزایش درصد چربی در پنیر بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک تأثیر معنی‌داری نشان نداد که با نتایج Ryhanen و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت داشت.

pH یکی از فاکتورهای مهم محدود کردن زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در مواد غذایی می‌باشد. رشد

نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که میزان NPN پنیر در طول دوره نگهداری افزایش می‌یابد. افزودن پروبیوتیک به پنیر سبب تغییر میزان NPN پنیر می‌گردد که این تغییر بسته به درصد چربی شیر مورد استفاده در تولید پنیر متفاوت است و با افزایش درصد چربی، NPN افزایش می‌یابد. به نظر می‌آید افزایش میزان ترکیبات نیتروژنه غیرپروتئینی به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد. در تحقیقی دیگر مشاهده شد که باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA-5 باعث افزایش میزان NPN در پنیر سفیدآب نمکی می‌گردد (Murat et al., 2004). این نتایج با مطالعات سایر محققان نیز مطابقت داشت (Goncu and AlpKent, 2005; Bergamini et al., 2006; Ong et al., 2006).

افزودن باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس رامنوسوس، روند پروتئولیز را در پنیر افزایش داده که باگذشت زمان و دوره رسیدن پنیر، شدت این واکنش افزایش می‌یابد (Aljewicz et al., 2014). مطالعات دیگر نیز به فعالیت پروتئولیتیکی لاکتوباسیلوس پلاننتاروم و لاکتوباسیلوس کازئی اشاره نمودند و بیان کردند که خاصیت پروتئولیتیکی لاکتوباسیلوس پلاننتاروم شدیدتر بوده و باعث هیدرولیز بتا کازئین طی ۱۲۵ ساعت می‌شود که باگذشت زمان این روند کامل می‌شود (Noraini and Elmer, 1990). در تحقیقی دیگر مشخص گردید که میزان پروتئولیز اولیه در پنیر چدار حاوی پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پاراکازئی و بیفیدوباکتریوم، با نمونه کنترل تفاوت معنی‌داری ندارد

لاکتوباسیلوس کازئی در pH های پایین‌تر از ۴/۶ با مشکل مواجه می‌شود. در حالی که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در pH = ۴ نیز توانایی رشد دارد. با توجه به این موضوع بررسی pH ماده غذایی جهت بررسی زنده‌مانی و فعالیت باکتری‌های پروبیوتیک حائز اهمیت می‌باشد (Karimi et al., 2011). پنیر لاکتیکی با pH حدود ۵ تا ۶ به‌عنوان یک ماده غذایی مناسب جهت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک مطرح می‌باشد. pH نمونه‌های مختلف پنیر طی دوره نگهداری کاهش معنی‌داری را نشان داد. pH در هیچ‌یک از گروه‌های پروبیوتیک به کمتر از ۵/۲ نرسید که شرایطی مناسب برای بقای باکتری را فراهم می‌سازد. مطالعات دیگر نیز به کاهش pH پنیر سفید ایرانی به دنبال افزودن باکتری لاکتوباسیلوس LA-5 اشاره نمودند (Sabbagh et al., 2010). افزودن بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و لاکتوباسیلوس پاراکازئی به پنیر نیز در کاهش مشخص روند pH طی دوره نگهداری مؤثر بود. شدت کاهش pH، بسته به سویه باکتری پروبیوتیک متفاوت است و باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در مقایسه با لاکتوباسیلوس پاراکازئی تأثیر بیشتری در کاهش pH دارد (Zomoridi et al., 2011). به نظر می‌آید کاهش pH طی دوره نگهداری پنیر، به دلیل فعال ماندن آنزیم بتاگالاکتوزیداز در دمای یخچال، تجزیه قند لاکتوز و تولید اسید آلی توسط آن می‌باشد (Kialasapthy and Masondolel, 2005). بر این اساس، تولید اسید توسط استارترهای تجاری و همچنین سویه‌های پروبیوتیک، سبب کاهش pH طی دوره نگهداری پنیر می‌گردد (Ong et al., 2007).

می‌شود. پروبیوتیک‌ها با پروتئولیز کازئین می‌توانند روی ویژگی‌های بافتی و سرعت اسیدی شدن پنیر و شیر تأثیرگذار باشند.

در مطالعه حاضر، افزودن پروبیوتیک، سبب کاهش روند رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولای شد. مطالعات گذشته به خاصیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس علیه لیستریا مونوسایتوزنز اشاره کرده‌اند (Millet et al., 2007). در مطالعه‌ای مشخص شد که افزودن لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، سبب کاهش جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس ماست، طی ۸ روز نگهداری گردید و مدت زمان بقای این میکروارگانیسم بیماری‌زا به یک‌سوم کاهش یافت (Salvatierra et al., 2004). طی تحقیق دیگری نیز بیان شد که افزودن لاکتوباسیلوس گاروئی (*Lactobacillus garvieae*)، لاکتوباسیلوس لاکتیس و انتروکوکوس فکالیس به شیر میکرو فیلتر شده سبب مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس SA15 پس از ۶ ساعت می‌گردد. محققین بیان کردند که لاکتوباسیلوس گاروئی مؤثرترین سویه در مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس است (Even et al., 2009). در مطالعه دیگر به اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس فرمانتوم در برابر میکروارگانیسم‌های اشریشیا کولای، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تایفی موریوم و شیگلا در پنیر اشاره شد (Songisepp et al., 2004). همچنین مشخص شده است که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم سبب مهار رشد اشریشیا کولای، استافیلوکوکوس اورئوس، کاندیدا آلبیکانس و باسیلوس سرئوس می‌گردد (Georgieva et al., 2015). گونه‌های لاکتوباسیلوس با تولید پراکسید هیدروژن،

اما بعد از گذشت زمان، پروتئولیز ثانویه به‌طور مشخص پیشرفت می‌کند (Ong et al., 2006). در مطالعه حاضر نیز افزودن پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) سبب افزایش معنی‌دار در میزان ترکیبات ازته فرار در مقایسه با گروه کنترل شده است که این افزایش ناشی از فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد.

افزودن لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، سبب کاهش روند اکسیداسیون در پنیر لاکتیکی گردید. در مطالعه دیگر نیز به نقش لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی در جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها در پنیر چدار طی دوره نگهداری اشاره شده است (Aparna et al., 2009). افزودن لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلاتناروم و لاکتوباسیلوس برویس به پنیر باعث بهبود و تقویت خاصیت آنتی‌اکسیدانی فرآورده و کاهش روند اکسیداسیون چربی‌ها می‌شود (Mehvesh, 2016). این نتایج در مطالعه دیگر نیز تأیید گردید (Songisepp et al., 2004).

مطالعات مختلفی در ارتباط با اثرات افزودن پروبیوتیک بر ویژگی‌های حسی پنیر صورت گرفته است. برخی از نتایج حاکی از عدم تغییر قابل توجه و مشخص ویژگی‌های بافتی پنیر است (Gobbetti et al., 1999; Jurkiewicz, 1997). در حالی که برخی دیگر به وجود اختلافات معنی‌دار مثبت یا منفی در مقایسه با کنترل (غیر پروبیوتیک) اشاره می‌کنند (Stanton et al., 2001; Ryhanen et al., 1998). به نظر می‌رسد گونه و جنس پروبیوتیک مصرفی و همچنین فاکتورهای فرآیند تولید پنیر و انبارمانی آن باعث اختلافات قابل توجهی

### سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شیراز و زحمات سرکار خانم مهندس آغازی در انجام مراحل تحقیق و همچنین مدیریت شرکت فرآورده‌های لبنی وارنا کمال تشکر و قدردانی را داریم.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

اسید لاکتیک، باکتریوسین و ترکیبات مشابه آن و ترکیبات ناشناخته مقاوم به حرارت، اثرات ضد میکروبی مشخصی را در برابر باکتری‌های بیماری‌زا نشان می‌دهند (Servin, 2004).

این مطالعه نشان داد در صورتی که پنیر لاکتیکی حین عملیات تولید و بسته‌بندی احتمالاً به باکتری‌های بیماری‌زا آلوده شود، دو باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازویی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نه تنها می‌توانند رشد آن‌ها را مهار کرده بلکه در مدت نگهداری موجب کاهش تعداد آن‌ها نیز می‌شوند.

### منابع

- Akineden, O., Hassan, A.A., Schneider, E. and Usleber, E. (2008). Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2): 211-216.
- Alam, Z. and Fareed, U. (2016). A simple Spectrophotometric Method for the Determination of Thiobarbituric Acid Reactive substances in Fried Fast Foods. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 26: 1-5.
- Aljewicz, M., Cichosz, G., Nalepa, B. and Kowalska, M. (2014). Influence of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on proteolysis patterns of Edam cheese. *Food Technology*. 52 (4): 439-447.
- Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), (2005). Official Method of Analysis, AOAC International. 18<sup>th</sup> Edition. AOAC international, Gaithersburg, USA.
- Aparna, G., Bimlesh, M., Rajesh, K. and Ram, B. S. (2009). Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62 (3): 339-347.
- Barbano, D.M., Lynch, J.M and Fleming, J.R. (1991). Direct and indirect determination of true protein content of milk by Kjeldahl analysis: collaborative study: collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 74: 281-288.
- Bergamin, C.V, Hynes, E.R, Quiberoni, A., Suarez, V.B. and Zalazar, C.A. (2005). Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. *Food Research International*, 38: 597-604.
- Bergamini, C.V., Hynes, E.R. and Zalazar, C.A. (2006). Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, 16: 856-866
- Buriti, F.C., da Rocha, J.S., Assis, E.G. and Saad, S.M. (2005). Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *LWT-Food Science and Technology*, 38: 173-80.
- Charlier, C., Cretenet, M., Even, S. and Le Loir, Y. (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 131(1): 30-39.

- Cirra Kiiyukia. 2003. Food microbiology for Ethiopian health and nutrition research institute, Academia press, pp. 37-63.
- Corbo, M., Albenzio, M., De Angelis, M., Sevi, A. and Gobbetti, M. (2001). Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 84: 551-61
- Daigle, A., Roy, D., Belanger, G. and Vuilleumard, J. (1999). Production of probiotic cheese (cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. *Journal of Dairy Science*, 82: 1081-91.
- Dinakar, P. and Mistry, V. (1994). Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 77: 2854-64.
- Even, S., Charlier, C., Nouaille, S., Ben Zakour, N.L., Cretenet, M., Cousin, F.J., *et al.* (2009) *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. *Applied Environmental Microbiology*, 75(13):4459-72.
- Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G. and Stefanova, N. (2015). Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. Intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(1): 84-91.
- Ghaemi, H., Hesari, J. and Pourahmad, R. (2012). Production of synbiotic UF Iranian white cheese using *Lactobacillus acidophilus* and inulin. *Electronic Journal of Food Processing & Preservation*, 2(4): 19-32.
- Ghodussi, H.B. and Robinson, R.K. (1996). The test of time. *Dairy Industries International*, 61: 25-8.
- Gobbetti, M., Corsetti A, Smacchi E, Zocchetti A, de Angelis M. 1997. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 81: 37-47.
- Gomes, A.M. and Malcata, F.X. (1998). Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *Journal of Dairy Science*, 81: 1492-1507.
- Goncu, A. and Alpkent, Z. (2005). Sensory and chemical properties of white pickled cheese produced using kefir, yoghurt or a commercial cheese culture as a starter. *International Dairy Journal*, 15: 771-776.
- Hayes, M., Coakley, M., O`Sullivan, L., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G.F., *et al.* (2006). Cheese as a delivery vehicle for Probiotic and biogenic substances. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61 (2): 132-141.
- Hekmat, S. and McMahon, D.J. (1992). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of Dairy Science*, 75: 1415-22.
- Heller, K.J., Bockelmann, W., Schrezenmeir, J. and deVrese, M. (2003). Cheese and its potential as a Probiotic food. In E. R. Farnwort (Ed), *Handbook of fermented functional foods*. Boca Raton: CRC Press, pp. 203-225.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI), (1995). Milk and milk products- Determination of titrable acidity and value pH –Test method. 1<sup>st</sup> revision, ISIRI No. 2852. [In Persian].
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI), (2005). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Enumeration of coagulase – Positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species ) – Test method Part 1 : Technique using baird – parker agar medium. 1<sup>st</sup> revision, ISIRI No. 6806-1. [In Persian].
- Jurkiewicz, C.H. (1999). Avaliac,~ao das caracter´isticas microbiol ´ogicas, f´isico-qu´imicas e sensoriais de queijo minas frescal elaborado com culturas probi`oticas de *Lactobacillus acidophilus*. In: Departamento de Alimentos e Nutric,~ao Experimental, Faculdade de Ci^encias Farmac^e uticas. Universidade de S~ao Paulo, P. 134.



- Karimi, R., Mortazavian, A.M. and Cruz, A.G. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Science and Technology*, 91: 283–308.
- Karimi, R., Sohrabvandi, S., & Mortazavian, A. M. (2012). Sensory characteristics of probiotic cheese. *Review in Food Science & Food Safety*, 11: 437-451.
- Kasımoğlu, A., Goncuoğlu, M. and Akgun, S. (2004). Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Journal*, 14: 1067-73.
- Kazemi Darsanaki, R., Laleh Rokhi, M., Azizollahi, M. and Issazadeh, K. (2012). Antimicrobial activities of lactobacillus strains isolated from fresh vegetables. *Middle-East of Science Research*, 11(9): 1216-1219.
- Khosrowshahi, A., Madadlou, A. and Ebrahim zadeh Mousavi, M. (2006). Monitoring the chemical and textural changes during ripening of Iranian white cheese made with different concentrations of starter. *Journal of Dairy Science*, 89: 3318-3325.
- Kialasapathy, K. and Masondolel, L. (2005). Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60: 252-258.
- Lankaputhra, W.E.V. and Shah, N.P. (1998). Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids, *Mutation Research*, 397: 169–182.
- Mehvesh, M. Adil, G., Masoodi, FA. and Mudasir, A. (2016). Himalayan cheese (Kalari / Kradi) – Effect of different probiotic strains on oxidative stability, microbiological, sensory and nutraceutical properties during storage. *Food Science and Technology*, 67: 74-81.
- Meilgaard, M.C., Civille, G.V. and Carr, B.T. (2007). *Sensory Evaluation Techniques*, (4th edn) CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Millet, L., Saubusse, M., Didiene, R., Tessier, L. and Montel, M.C. (2007). Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *International Journal Food Microbiology*, 108: 105-114.
- Murat, Y., Barbaros, H.O. and Ferit, A. (2004). Survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in white-brined cheese. *International journal of food sciences and nutrition*, 55(1): 53-60.
- Noraini, M.K. and Elmer, H.M. (1990). Proteolytic activity by strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science*, 73(11): 3068-3076.
- Ong, L., Henriksson, A. and Shah, N.P. (2006). Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal*. 16 (5), 446-456.
- Ong, L., Henriksson, A. and Shah, N.P. (2007). Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium* sp. *International Dairy Journal*, 17: 937-945.
- O'Riordan, K. and Fitzgerald, G. (1998). Evaluation of bifidobacteria for the production of antimicrobial compounds and assessment of performance in cottage cheese at refrigeration temperature. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 103-114.
- Rosenthal, I. and Bernstein, S. (1998). The survival of a commercial culture of *Bifidobacteria* in milk products. *Milchwissenschaft*, 53: 441-443.
- Ross, R.P., Fitzgerald, G., Collins, K. and Stanton, C. (2002). Cheese delivering biocultures: probiotic cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57 (2): 71-78.
- Rybka, S. and Kailasapathy, K. (1995). The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 50: 51-57.
- Ryhanen, E.L., Pihlanto-Leppala, A. and Pakkala, E. (2001). A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal* 11: 441–447.



- Sabbagh, N., Gheisari, H.R. and Aminlari, M. (2010). Monitoring the Chemical and Microbiological Changes during ripening of Iranian probiotic Low-Fat white cheese. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 4: 249-257.
- Salvatierra, M., Molina, A., Gamboa Mdel, M. and Arias, M.L. (2004) Evaluation of the effect of probiotic cultures on two different yogurt brands over a known population of *Staphylococcus aureus* and the production of thermonuclease. *Centro de Investigacion en enfermeda des Tropicales. facultad deMicrobiologia. Universidad de Costa Rica*, 54(3): 298-302.
- Saxelin, M., Korpela, R. and MayraMakinen, A. (2003). Introduction: classifying functional dairy products. In T. Mattila-Sandholm, & M. Saarela (Eds.), *Functional dairy products*. Boca Raton, LA, USA: CRC Press, pp. 1-16.
- Servin, AL. (2004). Antagonistic activities of *lactobacilli* and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28: 405-440.
- Shah, N.P. (2000). Some beneficial effects of probiotic bacteria. *Bioscience Microflora*, 19: 99-106.
- Songisepp, E., Kullisaar, T., Hutt, P., Elias, P., Brilene, T., Zilmer, M., et al. (2004). A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity. *Journal of Dairy Science*, 87 (7): 2017-2023.
- Sreekumar, O. and Mosono, A. (2000). Immediated effect of lactobacillus on the intestinal flora and fecal enzyme of rats and in vitro inhibition of E.coli in coculture. *Journal of Dairy Science*, 93: 931-939.
- Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G. and Ross, R.P. (1998). Probiotic cheese. *International Dairy Journal*, 8 (5-6): 491-496.
- Talwalkar, A., Miller, C.W., Kailasapathy, K. and Nguyen, M.H. (2004). Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science and Technolgy*, 39(6): 605-611.
- Vinderola, C., Prosello, W., Ghiberto, D. and Reinheimer, J.A. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* & *Lactobacillus casei*) & nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese, *Journal of Dairy Science*, 83(9): 1905-1911.
- Zomoridi, S., Khosrowshahi, A., Razavi Rohani, S. and Miraghaei, S. (2011). Survival of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* in free and microencapsulated forms on Iranian white cheese produced by ultrafiltration. *International Journal of Dairy Technology*, 64: 84-91.



## Effect of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* on the survival of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in lactic cheese and its qualitative characteristics

Farahi ashtiani, R.<sup>1</sup>, Shekarforoush, Sh.<sup>2\*</sup>, Gheisari, H.R.<sup>3</sup>, Basiri, S.<sup>4</sup>, Eskandari, M. H.<sup>5</sup>

1. PhD Graduate of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Professor of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
3. Associate Professor of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
4. Assistant Professor of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
5. Associate Professor of Food Science and Technology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

\*Corresponding Author: shekar@shirazu.ac.ir

(Received: 2019/11/3 Accepted: 2021/1/3)

### Abstract

Some probiotic microorganisms can prevent the growth of pathogenic microorganisms in addition to improve the intestinal microbial balance. In this study, the qualitative characteristics and viability of two foodborne pathogens (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) lactic cheese were investigated. For this purpose, in the first stage, four types of lactic cheese (60 samples) were produced as probiotics (containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*) and non-probiotic with 3 and 4.5% fat milk in three replicates, and the quality parameters were evaluated at days 0, 14, 28, 42 and 56. Then, 12 types of lactic cheeses [(probiotic/non-probiotic) fat percentage (3 and 4.5%) and pathogenic microorganisms (absence, presence of *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli*)] (180 samples) were prepared and the viability of pathogenic microorganisms in the presence of probiotic was evaluated on days 0, 7, 14, 28 and 35. The addition of probiotics to lactic cheese significantly reduced fatty acid oxidation and increased acidity and volatile nitrogen compounds ( $P < 0.05$ ). The addition of probiotics to high-fat cheeses increased non-protein nitrogen compounds but decreased in low-fat cheeses. The addition of probiotic to lactic cheese significantly reduced the growth of *S. aureus* and *E. coli* ( $P < 0.05$ ). Increasing fat percent did not show a significant effect on bacterial growth inhibition by probiotics ( $P < 0.05$ ). Due to the effects of adding probiotics on decreasing the pathogenic bacterial growth and not significantly altering the sensory properties of lactic cheese, it is recommended to use these probiotics in the production of low-fat lactic cheese.

**Conflict of interest:** None declared.

**Key words:** Lactic cheese, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.