مطالعه بر روی کاربرد استفاده از سویه‌های وحشی *لاکتوکوکوس لاکتیس* به عنوان آغازگر در کاهش *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر آب نمکی

بهاره بهارلو[۱]، فاطمه نجاتی[۲*]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۵/۱٦ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۲)

چکیده

از نقطه‌نظر تکنولوژیکی، پنیر یک محیط مغذی برای رشد میکروب‌های مختلف از جمله باکتری‌های بیماری‌زا مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* است. در حال حاضر، اگرچه استفاده از ترکیبات ضد میکروبی شیمیایی و طبیعی برای بهبود کیفیت میکروبی و افزایش عمر نگهداری راه‌کار رایج به شمار می‌رود ولی تحقیقات برای یافتن راه‌های جایگزین همچنان ادامه دارد. در این بررسی اثر سه سویه از *لاکتوکوکوس لاکتیس* به نام‌های FK23،DC103،JP51 بر زنده‌مانی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر مورد ارزیابی قرارگرفت. نمونه‌های تولیدشده از نقطه نظر ویژگی‌های شیمایی پنیر و شمارش باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در طی ۲۰ روز انبارداری مورد ارزیابی قرار گرفته و با نمونه شاهد مقایسه شدند. نتایج نشان داد که در پنیرهای تولید شده با هریک از سویه های FK23،DC103،JP51 تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* کاهش معنی‌داری در مقایسه با نمونه شاهد داشت. طبق نتایج، پنیر تهیه شده با سویه JP51 نسبت به نمونه‌های دیگر دارای کمترین تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (log cfu/ml ۲) پس از ۲۰ روز بود. بنابراین، بررسی حاضر نشان داد که *لاکتوکوکوس لاکتیس* سویه JP51 قابلیت خوبی برای استفاده به عنوان آغازگری با فعالیت ضدمیکروبی در تولید پنیر دارد، اگرچه بررسی تاثیر آن بر خصوصیات بافتی و حسی پنیر در تحقیقات بعدی ضروری به نظر می‌رسد.

کلید واژگان: آغازگر، *استافیلوکوکوس اورئوس*، پنیر، *لاکتوکوکوس لاکتیس*، فعالیت ضد میکروبی

* مسئول مکاتبات: nejati.iut3@gmail.com

۱- مقدمه

امروزه محصولات لبنی جایگاه ممتاز و ویژه‌ای در برنامه غذایی دارند، در بین فرآورده‌های لبنی، پنیر یکی از پرطرفدارترین محصولات لبنی در دنیا است به طوری که در حال حاضر بیش از ۸۰۰ نوع پنیر با روش‌های متفاوت تولید می‌شود. پنیر یکی از مواد غذایی مغذی برای انسان بوده و سرشار از پروتئین، چربی، ویتامین‌ها و املاح مختلف است. با این حال، محیط مغذی برای رشد میکروب‌های مختلف از جمله باکتری‌های بیماری‌زایی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا*، باکتری‌های اسید لاکتیک و غیره نیز می‌باشد [۱, ۲]. به منظور از بین بردن پاتوژن‌ها نیاز به فرایند حرارتی کافی می‌باشد که گاهی این فرایند حرارتی موجب کاهش شدید مواد مغذی شیر می‌شود. لذا استفاده از برخی ترکیبات ضدمیکروبی شیمیایی یا طبیعی برای بهبود کیفیت میکروبی و افزایش عمر نگهداری محصولات لبنی استفاده می‌شود.

امروزه تلاش‌های زیادی درجهت استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی صورت گرفته است یکی از این ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی نایسین[1] است [۳]. این ترکیب توسط برخی از سویه‌های باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس*[2] تولید می‌شود و علیه طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت فعالیت دارد. سویه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس*، به دلیل برخی خصوصیات تکنولوژیکی منحصر به فرد، یکی از آغازگرهای پرکاربرد در تولید برخی از محصولات لبنی همچون خامه و پنیر می‌باشد. نایسین در تحقیقات متعددی به عنوان مهار کننده *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر مورد بررسی قرار گرفته و فعالیت مهارکنندگی آن به اثبات رسیده است [٤-٦]. با این حال از آنجا که نایسین، به دلیل مراحل خالص‌سازی پیچیده، ترکیبی گرانقیمت است، استفاده آن در پنیر به عنوان یک نگهدارنده تاکنون به صورت تجاری درنیامده است. از این رو، درصورتی که باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* بتواند آنرا به میزان کافی در محیط پنیر تولید کند، استفاده از باکتری می‌تواند راهکاری مقرون به صرفه‌تر باشد. بر این اساس، هدف از تحقیق حاضر ارزیابی امکان استفاده از تعدادی سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس*، به عنوان آغازگر، بر کاهش تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر، بدون استفاده از ترکیبات نگهدارنده است [۷].

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه نمونه و مواد

در این مطالعه، شیر تازه گاو با مقدار چربی ۰/۳ ± ۳/۵ درصد از دامداری‌های شهرستان شهرکرد در تولید پنیر مورد استفاده قرار گرفت. دیگر مواد مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از: آنزیم منعقد کنندهٔ شیر (میتو، کمپانی Sangyo، ژاپن)، پودر شیر خشک بدون چربی (پگاه اصفهان) و نمک‌های تجارتی کلرید سدیم و کلرید کلسیم. محیط کشت نوترینت براث[3] (بیولایف[4]، ایتالیا) در فعال سازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و محیط کشت برد-پارکر آگار[5] (بیولایف، ایتالیا) در شمارش این باکتری استفاده شد. از محیط کشت M17 براث (سیگما، آلمان) برای فعال‌سازی سویه های *لاکتوکوکوس لاکتیس* مورد استفاده گردید. سویه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* مورد استفاده در این تحقیق (DC103، FK23 و JP51)، قبلا توسط نجاتی و همکاران [۸] از پنیرهای سنتی جداسازی و به روش مولکولی (براساس 16s rDNA) شناسایی شده و در ادامه در تحقیقی دیگر توسط نجاتی و اولشلگر [۹]، فعالیت هر سه سویه در مهار *استافیلوکوکوس اورئوس* به صورت *in vitro* مورد تایید قرار گرفت.

۲-۲- آماده‌سازی آغازگرهای *لاکتوکوکوس لاکتیس* و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

سویه های *لاکتوکوکوس لاکتیس* ذخیره شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد، به محیط کشت M17 منتقل و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. هر یک از سویه‌های فعال شده با نسبت ٤٪ به ۵۰ میلی‌لیتر شیر

1. *Nicin*
2. *Lactococcus lactis*
3. Nutrient broth
4. Biolife
5. Baird-Parker Agar

خشک بازسازی شده (۱۰٪) استریل (۱۱۰ درجه سانتیگراد، ۱۰ دقیقه) تلقیح و به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری (در ۳۰ درجه سانتیگراد) شدند. در روز بعد (درصورتی که pH شیر به کمتر از ٤/٦ کاهش یافته باشد که نشان دهنده فعال بودن در بیشترین تعداد آغازگر است) شیر تخمیر شده به عنوان آغازگر در تولید پنیر استفاده شد. فعال‌سازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* Cowan 1 (ATCC 12598) در محیط نوترینت براث به مدت ۱۸ ساعت و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. پیش از فرآیند تولید پنیر، در آزمونی ارتباط سوسپانسیون باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با دانستیه نوری[6] آن (در طول موج ٦۰۰ نانومتر) ارزیابی شد و مقدار موردنیاز برای افزودن به شیر پنیرسازی به منظور دستیابی به مقدار 10^3 cfu/ml سنجیده شد [۱۰].

۲-۳- تولید پنیر

در این مطالعه، آماده سازی پنیر در پایلوت صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی- واحد شهرکرد انجام شد. در ابتدا برای هر تیمار مقدار ۷ کیلوگرم شیر در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد (۱۵ ثانیه) حرارت دیده و بلافاصله تا دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد سرد شد. آغازگرهای فعال شده با نسبت ۰/۵ درصد (٦/۰-٦/۵ log cfu/ml شیر) به شیر اضافه شده و پس از گذشت مدت ۳۰ دقیقه، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به میزان 10^3 cfu/mlشیر، به هریک از نمونه‌های شیر حاوی آغازگر اضافه شد. همچنین یک تیمار شاهد حاوی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس و* بدون آغازگر *لاکتوکوکوس لاکتیس* تهیه شد. در ادامه کلرید کلسیم با نسبت ۰/۱ درصد و آنزیم منعقد کننده (در دمای ۳۵°C)، به میزان توصیه شده توسط تولید کننده، افزوده شدند. پس از ٤۰ دقیقه، دلمه به صورت مکعب‌های ۲ سانتی‌متری برش داده شد و پس از ۱۰ دقیقه در پارچه های صافی آبگیری شدند. عملیات پرس لخته به مدت ٦ ساعت انجام شد. سپس لخته به قطعات مساوی برش داده شده و در آب نمک ۲۰٪ به مدت ٤ ساعت قرار گرفتند. در پایان قطعات پنیر در قوطی‌های فلزی نیم کیلویی محتوی آب نمک ۱۲ درصد بسته‌بندی و به مدت ۲۰ روز در دمای ۲۰-۱۸ درجه نگهداری شدند. نمونه‌برداری در روزهای ۱، ٤، ٦، ۱۳ و ۲۰ انجام گرفت و آزمون‌های شیمیایی شامل pH، اسیدیته، نمک و رطوبت و آزمون میکروبی شامل شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* صورت گرفت.

۲-٤- آزمون‌های شیمیایی

pH با استفاده از دستگاه pH متر (WTW، انگلستان) اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری اسیدیته، ۱۰ گرم پنیر در ۹۰ میلی‌لیتر آب همگن شد و سپس با کاغذ صافی صاف شد. ۲۵ میلی‌لیتر از محلول صاف شده در حضور فنل فتالئین ۵٪ با سود ۰/۱ نرمال تیتر گردید [۱۱]. رطوبت در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد اندازه‌گیری شد. میزان نمک در نمونه‌ها با استفاده از روش تیتراسیون ولهارد تعیین شد [۱۱].

۲-۵- شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس*

میزان ۱۰ گرم از هریک از نمونه‌های پنیر در ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی حاوی ۲ درصد سیترات سدیم به صورت کامل همگن شد و سپس رقت‌های بعدی به صورت ترتیبی از آن تهیه شد. رقت‌های ۱ الی ۵ به صورت سطحی در محیط کشت برد پارکر آگار کشت داده شدند. پس از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعداد کلونی‌ها شمارش و تعداد باکتری‌های زنده به صورت log cfu/g پنیر گزارش شد [۱۲].لازم به ذکر است که شیر حرارت دیده، قبل از تلقیح *استافیلوکوکوس اورئوس*، عاری از این باکتری شناسایی شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آزمون‌های شیمیایی

تغییرات pH، اسیدیته، نمک و رطوبت نمونه‌های پنیر تهیه شده با استفاده از هر یک از ۳ سویه باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* و یک نمونه شاهد بدون آغازگر که به همگی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس نیز تلقیح شده بود*، در طی یک دوره نگهداری ۲۰ روزه در جدول ۱ نشان داده شده است.

6 . Optical density (OD)

Table 1 The chemical changes in brined cheese samples produced by *L. lactis* during 20 days storage at 20 °C

Day of sampling					Treatment
20	14	6	4	1	
pH					
4.00±0.01 cA	4.07±0.01 cA	4.11±0.01 cA	4.82±0.06 bA	5.68±0.01 aA	JP51
4.29±0.05 eB	4.50±0.01 dC	4.70±0.05 cB	5. 42±0.09 bB	5.78±0.03 aA	FK23
4.10±0.01 dA	4.31±0.01 cB	4.53±0.02 bB	5.60±0.11 aB	5.75±0.03 aA	DC103
5.09±0.01 dC	5.41±0.01 cD	5.63±0.03 bC	5.81±0.01 bC	6.06±0.03 aB	Control
Acidity (%)					
1.24±0.02 dA	1.18±0.01 cA	1.15±0.01 cA	0.75±0.01 bA	0.34±0.01 aA	JP51
1.03±0.03 eC	0.93±0.01 dC	0.80±0.01 cC	0.51±0.01 bB	0.30±0.01 aA	FK23
1.16±0.01 eB	1.08±0.01 dB	0.92±0.01 cB	0.48±0.03 bB	0.32±0.01 aA	DC103
0.65±0.01 dD	0.51±0.01 cD	0.41±0.01 bD	0.31±0.16 aC	0.30±0.01 aA	Control
Salt (%)					
2.40±0.01 eA	2.10±0.02 dA	1.91±0.01 cB	1.41±0.00 bA	1.10±0.02 aA	JP51
2.28±0.01 eA	1.91±0.02 dA	1.76±0.03 cA	1.31±0.01 bA	1.06±0.03 aA	FK23
2.50±0.01 eA	2.03±0.03 dA	1.93±0.01 cB	1.70±0.01 bB	1.42±0.01 aB	DC103
2.81±0.03 dB	2.45±0.02 cB	1.90±0.05 bB	1.78±0.03 bB	1.31±0.04 aB	Control
Moisture (%)					
51.90±0.01 dB	50.90±0.05 cB	49.10±0.09 cB	46.43±0.97 bAB	44.00±0.51aB	JP51
48.49±0.10 dA	47.48±0.17 cdA	46.43±0.13 bcA	45.34±0.18 abA	43.00±0.29 aA	FK23
50.44±0.28 bB	50.54±0.27 bB	49.50±0.28 bB	49.10±0.14 bC	47.70±0.35 aC	DC103
47.98±0.02 bA	47.81±0.05 bA	46.81±0.14 bA	47.24±0.27 bB	45.08±0.11 aB	Control

[abc] Different small letters in the same raw indicate significant differences within the same isolate ($p < 0.05$)
[ABC] Different capital letters in the same column indicate significant differences within the same time ($p < 0.05$)
Mean ± SME (n = 3)

pH تمامی نمونه‌ها در طی دوران نگهداری روند کاهشی نشان داد هرچند که این تغییر درمورد نمونه‌های حاوی آغازگر *لاکتوکوکوس لاکتیس* با سرعت بیشتری اتفاق افتاد به طوریکه pH نمونه حاوی آغازگر JP51 در روز چهارم و pH نمونه‌های حاوی هریک از دو باکتری FK23 و DC103 در روز ششم به کمتر از ۵ کاهش یافت. نمونه شاهد نیز اگر روند کاهشی pH را نشان داد ولی در پایان ۲۰ روز نگهداری pH به کمتر از ۵ کاهش نیافت. تغییرات جزئی pH پنیر شاهد احتمالا به دلیل حضور باکتری‌های اسید لاکتیک طبیعی موجود در شیر خام است که برخی می‌توانند دمای پاستوریزاسیون را تحمل کرده و وارد پنیر شوند. درمجموع سویه JP51 توانست pH پایین‌تری را نمونه های پنیر در تمام طول دوره نگهداری ایجاد نماید، اگر در روز بیشتم pH این نمونه با نمونه تهیه شده به کمک سویه DC103 تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($p < ۰/۰۵$). کاهش pH مشاهده شده در تحقیق حاضر توسط سویه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* با تحقیق رودریگز و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت دارد [۱۳].

همزمان با کاهش pH، اسیدیته نیز در تمامی نمونه ها روند افزایشی معنی‌داری را در طول زمان و در تمامی نمونه‌ها نشان داد ($p < ۰/۰۵$)، به طوریکه اسیدیته از حدود ۰/۳۰ درصد در روز اول به بالاتر از ۱درصد در روز بیستم درمورد تمام نمونه‌های حاوی *لاکتوکوکوس لاکتیس* افزایش یافت، درحالیکه در نمونه شاهد در روز بیستم اسیدیته ۰/۰۱ ± ۰/۶۵ درصد اندازه‌گیری شد (جدول ۲) . سویه JP51 بیشترین افزایش اسیدیته را نسبت به دو سویه دیگر نشان داد که به صورت معنی‌دار از سایر نمونه‌ها (به جز نمونه حاوی DC103 در روز بیستم) بالاتر بود ($p < ۰/۰۵$)، که با نتایج جاصل از pH مطابقت دارد.

روند تغییرات نمک نمونه های تهیه شده با سه باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* در طی دوران رسیدگی ۲۰ روزه در همگی نمونه‌ها روند افزایشی نشان داد، که دلیل آن نفوذ نمک از آب نمک به داخل بافت پنیر تحت تاثیر فشار اسمزی است [۵]. این تغییرات، از میزان ۰/۰۳ ± ۱/۰۶ درصد در روز اول برای نمونه حاوی FK23 تا میزان ۰/۰۳ ± ۲/۸۱ درصد در روز بیستم برای نمونه شاهد را در برمی‌گیرد.

روند تغییرات رطوبت نمونه های تهیه شده با سه باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* در طی دوران رسیدگی ۲۰ روزه نشان داد که تغییرات درصد رطوبت در تمامی نمونه‌ها در طول نگهداری روند افزایشی دارد. این افزایش با نتایج درستی و همکاران، در مورد پنیر آب نمکی مطابقت دارد[۱٤]. تغییرات رطوبت در طی رسیدگی پنیر از یک سو تابع روند تغییرات pH می‌باشد (اسیدیته بیشتر منجر به خروج آب بیشتر می‌شود) و از سوی دیگر بستگی پروفیل پپلی پپتیدها و پپتیدهای تولید شده در طی پروتئولیز پنیر دارد. در صورتی که پپتیدهای تولید شده قدرت آبدوستی بیشتری داشته باشند آب بیشتری در بافت باقی می‌ماند و بالعکس. با این حال به دلیل تغییرات مداوم پروفیل پپتیدی و تغییر در بار پپتیدها در نتیجه پروتئولیز تغییرات رطوبت در طی زمان می‌تواند با نوساناتی روبرو گردد. بیشترین اختلاف رطوبت در میان نمونه‌ها، درمورد پنیر تهیه شده با سویه JP51 مشاهده شد و نمونه شاهد و نمونه تهیه شده با سویه DC103 کمترین تغییرات در افزایش رطوبت را نشان دادند (جدول ۱). با این حال، به طور کلی، روند افزایش در میزان رطوبت تا روز ششم بعد از تولید بیشترین معنی‌داری را داشته و پس ازآن این تغییرات کندتر مشاهده شد که دلیل آن می‌تواند پایدار شدن شرایط پروتئولیزی و تولید اسید باشد.

۳-۲- تغییرات تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

جدول ۲ روند تغییرات تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در طی ۲۰ روز نگهداری پنیرهای آب نمکی در حضور یا عدم حضور آغازگر لاکتیکی را نشان می‌دهد

Table 2 The viability of *S. auterus* (log cfu/g) in brined cheese samples produced by *L. lactis* during 20 days storage at 20 °C

Day of Sampling					Treatment
20	13	6	4	1	
2.00±0.57 dA	4.41±0.18 cA	5.39±0.20 bA	6.18±0.09 aA	6.23±0.09 aB	JP51
2.15±0.72 cAB	4.68±0.11 bAB	5.06±0.04 bA	6.19±0.08 aA	6.83±0.11 aAB	FK23
2.82±0.43 cB	5.34±0.01 bB	5.25±0.13 bA	6.43±0.13 aA	7.25±0.13 aA	DC103
8.15±0.07 bC	8.53±0.01 bC	8.06±0.01 abB	7.84±0.03 aB	7.25±0.01aA	Control

[abc] Different small letters in the same raw indicate significant differences within the same isolate ($p < 0.05$)
[ABC] Different capital letters in the same column indicate significant differences within the same time ($p < 0.05$)
Mean ± SME (n = 3)

با نگاه کلی به جدول ۲ می‌توان دریافت که تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های تهیه شده با هر یک از سه سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس* روند کاهشی و در نمونه شاهد روند افزایشی را دارد، و تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های پنیر تهیه شده با آغازگر *لاکتوکوکوس لاکتیس* به صورت معنی‌داری (p < ۰/۰۵) پایین‌تر از نمونه شاهد است. این تفاوت از همان روز اول و در مورد پنیر تهیه شده با سویه JP51 قابل مشاهده است. اگرچه در روز اول تفاوت معنی‌داری بین تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های پنیر تهیه شده با هریک از سویه‌های FK23 و DC103 با نمونه شاهد مشاهد نشد، ولی پس از آن به صورت جالبی تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* در هریک از این دو تیمار روند کاهشی در پیش گرفت به طوریکه در نمونه برداری دوم، یعنی در روز چهارم، تفاوت با نمونه شاهد به صورت معنی‌دار مشاهده شد. جالب آن است که در روز چهارم در نمونه‌های تهیه شده با هریک از ۳ سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس*، تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* حداقل یک سیکل لگاریتمی (log cfu/g ۰/۱۳ ± ٦/٤۳ برای نمونه پنیر تهیه شده با DC103) کمتر از نمونه شاهد (log cfu/g ۰/۰۳ ± ۷/۸٤) بود. این تفاوت در تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بین نمونه‌های تهیه شده با سویه های *لاکتوکوکوس لاکتیس* با نمونه شاهد در طی زمان افزایش یافت به طوریکه در روز ۲۰ ام این تفاوت بسیار مشخص و معنی‌دار بود (تعداد log cfu/g ۰/٤۳ ± ۸۲/۲ باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر تهیه شده با سویه DC103 در مقابل ۰/۰۷ ± ۸/۱۵ در پنیر شاهد). جالب آنست که در روز بیستم، پنیر تهیه

شده با سویه JP51 به صورت معنی‌دار تعداد کمتری از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در آن نسبت به پنیرهای تهیه شده با هریک از سویه های FK23 و DC103 شمارش شد (log cfu/g ۰/۵۷ ± ۲/۰۰). میردامادی و همکاران (۲۰۱۵) اثر افزودن همزمان ۳۰۰ یونیت بر میلی‌لیتر نایسین و همچنین *لاکتوکوکوس لاکتیس* تولید کننده نایسین را بر کاهش باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر فتا مورد ارزیابی قرار دادند [۱۵]. نتایج این تحقیق نشان داد که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در روز هفتم به log cfu/g ۵ و در روز چهاردهم به log cfu/g ٤ کاهش یافت که دقیقا با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد، اگرچه در تحقیق حاضر تنها از باکتری *لاکتوکوکوس* لاکتیس به تنهایی استفاده شده است. این نتیجه می تواند احتمال تولید ترکیبات باکتریوسین همچون نایسین توسط سویه‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر را تقویت کند. اگرچه تولید ترکیبات دیگری همچنین پراکسیدهیدروژن و اسیدهای آلی نیز می تواند در فعالیت بازدارندگی توسط باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* موثر باشد، ولی از آنجا که در مطالعه پیشین [۷, ۹] تنها این ۳ سویه از بین ۸ سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس* مورد ارزیابی قادر به مهار باکتری *استافیلوکوکوس لاکتیس* بودند احتمال تولید ترکیبات ضدباکتریایی اختصاصی توسط ۳ سویه مورد استفاده در تحقیق حاضر تقویت می‌شود. رودریگز و همکاران (۲۰۰۵) از ٤ سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس* تولید کننده نایسین و پدیوسین به همراه آغازگر مزوفیل تجاری در تولید پنیر استفاده نمودند. این محققان تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را بعد از ۱۵ روز انبارداری پنیر ۳/۵ الی ٤/۸ سیکل لگاریتمی در گرم پنیر گزارش کردند که با تحقیق حاضر مطابقت دارد [۱۳]. به نظر می‌رسد سویه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* مورد استفاده در تحقیق حاضر فعالیت ضد-استافیلوکوکوسی خوبی نسبت به سویه‌های بکار گرفته شده در تحقیق روذریگز و همکاران دارد، زیرا ایشان کمترین تعداد این پاتوژن را پس از ۳۰ روز log cfu/g ۱/۱۳ ± ۲/٤۵ گزارش کردند که تقریبا با تعداد شمارش شده در پنیرهای حاوی هریک از سویه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* پس از ۲۰ روز انبارداری در تحقیق حاضر مطابقت دارد. با این حال، انجام این مقایسه به سادگی نبوده و لازم است تفاوت‌های عملیاتی در شرایط تولید و نگهداری پنیر دراین مقایسه فعالیت لحاظ شوند.

لازم به ذکر است که اگرچه pH در نمونه‌های پنیر حاوی *لاکتوکوکوس لاکتیس* بسیار پایین‌تر از نمونه شاهد است، ولی بر طبق گزارش چارلیر و همکاران (۲۰۰۸) pH پایین اثر مهار کنندگی بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* ندارد [۱٦] و می‌توان پیش‌بینی نمود که فعالیت ضدباکتریایی مشاهده شده در تحقیق حاضر به دلیل تولید ترکیبات اختصاصی ضد میکروبی از جمله باکتریوسین‌ها می‌باشد. با این حال، لازم است تا در طی تحقیقات بعدی ترکیبات ضدباکتریایی تولید شده توسط این سویه‌ها به خوبی شناسایی شود.

٤- نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر، برای اولین بار به بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های بومی *لاکتوکوکوس لاکتیس* جدا شده از محصولات لبنی سنتی ایران به عنوان آغازگر در پنیر پرداخته شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* به عنوان آغازگر در پنیر اثر مهاری قوی بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته و استفاده از آن به عنوان آغازگر با فعالیت ضدباکتریایی طبیعی امیدوارکننده می‌باشد. با این حال لازم است اثر pH بر کاهش تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط یکسان با این تحقیق، در بررسی‌های آتی نیز ارزیابی و با میزان کاهش در حضور آغازگرهای لاکتیسی مورد استفاده در این تحقیق مقایسه گردد.

۵- منابع

[1] Rosengren, Å., Fabricius, A., Guss, B., Sylvén, S., Lindqvist, R. (2010). Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International Journal of Food Microbiology*. 144(2):263-9.

[2] Lindqvist, R., Sylvén, S., Vågsholm, I. (2002). Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*. 78(1):155-70.

[3] Favaro, L., Penna, A. L. B., Todorov, S. D. (2015). Bacteriocinogenic LAB from cheeses–Application in biopreservation? *Trends in Food Science & Technology*. 41(1):37-48.

[4] Davies, E., Bevis, H., Delves - Broughton, J. (1997). The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta - type cheeses to control the food - borne pathogen Listeria monocytogenes. *Letters in Applied Microbiology*. 24(5):343-6.

[5] Pinto, M. S., de Carvalho, A. F., dos Santos Pires, A. C., Souza, A. A. C., da Silva, P. H. F., Sobral, D., de Paula, J. C. J., de Lima Santos, A. (2011). The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. *International Dairy Journal*. 21(2):90-6.

[6] Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A., Degraeve, P. (2008). Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control*. 19(10):982-9.

[7] Charlier, C., Cretenet, M., Even, S., 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):30-9.

[8] Nejati, F., Gatto, V., Castioni, A., Tebaldi, M., Babaei, M., Fracchetti, F., Felis, G. E. (2015). Genetic diversity of enterococci from Iranian home-made artisanal dairy products. *Dairy Science & Technology*. 95(2):151-65.

[9] Nejati, F., Oelschlaeger, T. (2015). *In Vitro* characterization of *Lactococcus lactis* strains Isolated from Iranian Traditional Dairy Products as a Potential Probiotic. *Applied Food Biotechnology*. 3(1):43-51.

[10] Alomar, J., Loubiere, P., Delbes, C., Nouaille, S., Montel, M.-C. (2008). Effect of *Lactococcus garvieae, Lactococcus lactis and Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food Microbiology*. 25(3):502-8.

[11] Iranian International Standard No 6629-1. (1389). 1st ed. Milk and milk products- fresh cheese- Specifications and test methods (Persian).

[12] Hamama, A., El Hankouri, N., El Ayadi, M. (2002). Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. *International Dairy Journal*. 12(11):933-8.

[13] Rodrıguez, E., Calzada, J., Arqués, J., Rodrıguez, J., Nunez, M., Medina, M. (2005). Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 in cheese. *International Dairy Journal*. 15(1):51-7.

[14] Dorosti, S., Bazmi, A., Ghanbarzadeh, B., Ayaseh, A. (2011). Effect of brine concentration on the physicochemical properties of Iranian white cheese. *Journal of Food Science and Technology*. 8:1-10. In Persian.

[15] Mirdamadi, S., Ghazvini, S. A. (2015). A comparative study between inhibitory effect of *L. lactis* and nisin on important pathogenic bacteria in Iranian UF Feta cheese. *Biological Journal of Microorganism*. 3(12):79- 92.

[16] Charlier, C., Even, S., Gautier, M., Le Loir, Y. (2008). Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk. *International Dairy Journal*. 18(2):197-203.

A study on application of wild *Lactococcus lactis* strains as starter in reduction of *Staphylococcus aureus* in brined cheese

Baharloo, B. [1], Nejati, F. [2*]

1. MSc student, Department of Food Science and Technology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

(Received: 2016/08/06 Accepted: 2017/01/01)

As the technological point of view, cheese is a nutritious environment for growth of several of food-borne pathogens such as *Staphylococcus aureus*. Although, application of chemical and natural preservatives is common in prolongation of shelf-life of dairy products, so many researches are still running to find alternatives solutions. In this study, the effect of three strains of *lactococcus lactis* named as JP51, FK23 and DC103 was evaluated on viability of *S. aureus* in cheese. The produced cheese samples were analyzed for chemical composition and viability of *S. aureus* during period of 20 days of storage. The results showed that all three strains were able to significantly reduce the number of viable *S. aureus* in comparison to control. According to our results, the cheese manufactured by strain JP51 had the lowest number of *S. aureus* (2.00 log cfu/g) after 20 days of storage.

Subsequently, current study showed that *L. lactis* isolate JP51 can be considered as potent natural antibacterial starters for cheese production. However, it would be necessary to evaluate its effect on physical and sensorial properties of cheese.

Key words: Antibacterial activity, Cheese, *Lactococcus lactis*, Starter, *Staphylococcus aureus*

* Corresponding Author E-Mail Address: nejati.iut3@gmail.com