M.Sc. thesis abstract

Biopreservation of Domiati Like Cheese Using ProtectiveLactic Acid Bacterial Culture

Noha Atef Mohamed Gaber, Mohamed Gamal EL-Zieny, Ehab Eass Kheadr

Dairy Science and Technology, Faculty of Agriculture, Alexandria University, Alexandria, Egypt

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are used to manufacture many food products, mainly in the manufacture of fermented dairy and cheese. Their applications in these products are aimed at producing lactic acid and flavor compounds and improving the texture of the final product. In addition, the importance of LAB in the fermented food industry is increased when they are able to produce inhibitory compounds against pathogenic and spoilage species in food. This kind of biological competition is being exploited to develop protective microbial cultures, which have many applications in food preservation. This approach is known as biological food preservation. On the other hand, Domiati cheese is considered one of the most important dairy products in Egypt. It is made from buffalo, cow milk, or both. It is usually made from salted (5-12%) raw milk. Thus, some bacterial species, especially salt-tolerant such as *Staphylococcus aureus*, can be found in the final cheese. The general objective of this study is to evaluate the ability of some LAB isolates to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* in order to use some of them as a preventive culture in the production of whey-less Domiati-like cheese. This goal was accomplished as described below.

1-Evaluation of the ability of some LAB isolates to produce antimicrobial compounds against *Staphylococcus aureus*

The ability of 542 LAB isolates, previously isolated from raw milk and different milk products from many regions in Egypt, were screened for the production of evaluated to produce inhibitory compounds against *Staphylococcus aureus* using drop test, micro-dilution technique, and agar diffusion method.

The results indicated that cell-free extract supernatants of 8 isolates were able to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, suggesting the possible production of inhibitory compounds. The thermal stability of the inhibitory compounds was evaluated and they were found to be thermally stable even after treating the growth filtrate at 121°C for 20 min. The highest inhibitory effect against *Staphylococcus aureus* was observed at pH 3-4. Among 8 isolates, 3 produced inhibitory substances that have a proteinaceous (peptide) nature.

2- Genetic identification of isolates that are capable of producing antimicrobial compounds against *Staphylococcus aureus*

Eight isolates of LAB with importante activity against *Staphylococcus aureus* were identified genetically by sequencing 16S r-DNA gene and identified as follows:

Lactobacillus plantarum FFNL593
Lactobacillus plantarum FFNL158
Lactobacillus plantarum FFNL188
Lactobacillus plantarum FFNL190
Enterococcus faecium FFNL 417
Lactobacillus plantarum FFNL 94
Lactobacillus plantarum FFNL739
Lactobacillus plantarum FFNL1810

These strains were assessed to evaluate their safety in order to be used in the manufacture of some milk products. The evaluation included the ability to hydrolyze gelatin, DNA and blood and to produce histamine production as well as their resistance to various antibiotics. The results indicated that these strains were not able to hydrolyze gelatin, DNA, or blood, and none of them had the ability to produce histamine. Also, these strains did not show resistance to the tested antibiotics.

3- Evaluation of the protective effect of some *strains of Lactobacillus plantarum* for the control of *Staphylococcus aureus* in wheyless Domiati-like cheese

The ability of *Lactobacillus plantarum* strains FFNL1810 and FFNL739 to inhibit *Staphylococcus aureus* in whey-less Domiati-like cheese was studied. As these strains had the highest antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*, shown by *in vitro* assessments, they were selected to challenge the pathogen in Domiati-like cheese. The cheese was made using a mixture composed of dried skimmed milk, concentrated milk proteins (70%) and dried, butter, which were reconstituted in water. This reconstituted milk mixture (RMM) was homogenized and divided into 2 equal parts. The first part was salted (8%). Following pasteurization of salted and unsalted parts, they were cooled to 40ºC and the unsalted part was inoculated with a commercial yogurt culture and further divided into 2 parts. *Staphylococcus aureus* was added to the first part at a concentration of 10^5 cfu/ml. Two sets of experimental cheeses were manufactured as follows:

Set I: this set was made from *Staphylococcus aureus*-free reconstituted milk mixture and include the following cheeses

- **C^--cheese**: no *Lactobacillus plantarum* or *Staphylococcus aureus* was added to RMM.
- **LB1-cheese:** *L. plantarum* FFNL1810 (10^6/ml) was added to RMM.
- **LB2-cheese**: *L. plantarum* FFNL739 (10^6/ml) was added to RMM.
- **LBM-cheese**: a mixture of equal ratio of FFNL1810 and FFNL739 was added to RMM to obtain a total concentration o10^6 cfu/ml.

Set II: for cheeses, identical to those prepared in the first set, weremanufactured from *Staphylococcus aureus*-contaminated RMM as follows:

- **SC^+ -cheese:** no *Lactobacillus plantarum* was added to RMM.
- **SLB1-cheese:** *L. plantarum* FFNL1810 (10^6/ml) was added to RMM.
- **SLB2-cheese:** *L. plantarum* FFNL739 (10^6/ml) was added to RMM.
- **SLBM-cheese:** a mixture of equal ratio of FFNL1810 and FFNL739 was added to RMM to obtain a total concentration 10^6 cfu/ml.

The different mixtures were incubated for an hour at 40°C, mixed with equal volumes of salted RMM, renneted and left at 40°C for complete coagulation. Following coagulation, cheeses were kept at 6±1°C for 56 days. Microbiological and chemical analyzes and sensory attributes were evaluated in cheeses when fresh (immediately after being refrigerated) and after 14, 28 and 56 days of storage.

4-Regarding chemical composition of wheyless Domiati-like cheese

The results revealed that:

- There were no significant differences in the protein, ash, salt, and fat content among cheeses subjected to different treatments.
- There were no significant differences in the pH values between the different cheeses at the beginning of the storage period, while the pH values were significantly ($P < 0.05$) lower in cheeses-containing strain FFNL1810 (LB1 and LBM), compared with C^- and LB2-cheese. This may indicate the acidogenic capacity of FFNL1810. On the other hand, continuous increases in acidity accompanied by a gradual decrease in pH values were observed for all treatments as storage time was progressed.
- Addition of *Lactobacillus plantarum* to whey-less Domiati-like cheese did not have a significant effect on the moisture content of different cheeses. During storage, the moisture content in all treatments decreased gradually, as storage time was progressed.
- Addition of *Lactobacillus plantarum* resulted in a significant increase in the concentration of water-soluble protein in cheeses subjected to treatment LB1, LB2 and LBM. Cheese containing the strain FFNL1810 had more water-soluble protein than that with FFNL739. This may indicate the ability of strain FFNL 1810 to breakdown milk proteins at a higher level than FFNL739.
- At the beginning of storage, the concentration of total volatile fatty acids (TVFA) did not appear to be affected among cheeses by the addition of *Lactobacillus plantarum*. After 56 days of storage, the differences in TVFA content were more apparent. The highest concentration of TVFA was observed in cheese made with strain FFNL1810. While cheese with strain FFNL739 had a concentration of TVFA similar to that found in the control sample.

5-Regarding microbial changes of wheyless Domiati-like cheese

The results indicated that:

-The total bacterial counts of fresh cheese samples ranged from 10^6 to10^7 cfu/g. The cheese-containing strain FFNL739 showed a significant decrease in the total bacterial counts compared to that with strain FNNL1810.

-There was a significant decrease ($P < 0.05$) in the live numbers of *Staphylococcus aureus* in cheeses to which one of the two *Lactobacillus plantarum* strains or their mixture was added. The decrease in live numbers of *Staphylococcus aureus* ranged from 0.9 to 1.6 $\log_{10}$ cfu/g cheese. This inhibitory effect persisted throughout storage.

- The viable counts of *Lactobacillus plantarum* at the beginning of the storage period were 6.2-6.8 $\log_{10}$ cfu/g cheese. A gradual decrease ($P < 0.05$) was observed in viable counts of both strains as storage time was progressed. This reduction was more evident in the case of the FFNL739 strain compared to FFNL 1810.
- No viable counts of coliform bacteria could be detected in any of experimental cheeses throughout storage.

6-Regarding sensory evaluation wheyless Domiati-like cheese

Data of sensory assessments indicated an improvement ($P < 0.05$) in sensory attributes (texture, taste and overall acceptability) of cheeses with *Lactobacillus plantarum*. As storage time was progressed, there was a gradual decrease in sensorial quality of all cheeses but cheeses containing *Lactobacillus plantarum* retained their preference compared to control cheese.

الحفظ الحيوى لمشابه الجبن الدمياطى بإستخدام مزرعة وقائية من بكتريا حامض اللاكتيك

نهى عاطف محمد جابر - أيهاب عيسى خضر – محمد جمال الزينى

قسم علوم وتقنيه الالبان – كلية الزراعة – جامعة الأسكندرية

الملخص

تستخدم بكتريا حامض اللاكتيك فى صناعه العديد من المنتجات الغذائيه وبصفة أساسية فى صناعة الألبان المتخمرة والأجبان. وتطبيقاتها فى هذه المنتجات يكون بهدف أنتاج حامض اللاكتيك ومركبات الطعم والنكهة وتحسين قوامها. وتزداد أهمية بكتيريا حامض اللاكتيك فى صناعة الأغذية المتخمرة بقدرتها على انتاج مركبات مثبطة لنمو الأنواع البكتيرية الممرضة او تلك المسببة لفساد الأغذية. و يتم استغلال هذا النوع من التنافس البيولوجى لتطوير ما يعرف بأسم المزارع الميكروبية الواقية، والتي لها العديد من التطبيقات في حفظ الأغذية. يُعرف هذا النهج بالحفظ البيولوجي للغذاء.

ومن جهة أخري يعتبر الجبن الدمياطى احد اهم منتجات الالبان فى مصر. وهو يصنع من لبن جاموسي او بقري او خليط منهما. وعادة ما يصنع من لبن غير معامل حراريا بعد اضافة الملح إليه بنسبة تتراوح بين 5 إلى 12%. ويمكن لبعض الأنواع البكتيرية خاصة تلك التى تتحمل تركيزات مرتفعة من الملح مثل *Staphylococcus aureus* أن تتواجد فى الجبن الدمياطى.

والهدف العام لهذه الدراسة هو تقييم قدرة بعض العزلات التابعة لبكتيريا حامض اللاكتيك على تثبيط نمو المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* وذلك بهدف استخدام بعض من هذه العزلات كمزرعة وقائية لتثبيط هذا الميكروب فى الجبن المشابهة للجبن الدمياطى. وتم انجاز هذا الهدف كما سيتم ذكرة فيما يلى:

تقييم قدرة بعض عزلات بكتريا حامض اللاكتيك على انتاج مركبات مضاده لنمو المكورات العنقودية الذهبية فقد تم تقييم قدرة عدد 542 عزلة بكتيريه تابعة لبكتيريا حامض اللاكتيك تم عزلها من ألبان خام ومنتجات لبنيه مختلفه من مناطق عديدة فى مصر على انتاج مواد مثبطة لنمو المكورات العنقودية الذهبية وذلك بأستخدام اختبارات Drop test, micro-dilution technique, agar diffusion method

وقد اشارت النتائج الى ان 8 عزلة بكتيرية كانت قادرة على انتاج مواد فى راشح بيئة نموها يمكنها من تثبيط نمو المكورات العنقودية الذهبية. و تم تقييم الثبات الحرارى لهذه المواد ووجد انها ثابتة حراريا حتي بعد معاملة راشح النمو على 121م° لمدة 20 دقيقة. ووجد أيضا أن المواد المثبطة المنتجة بواسطة عدد 3 عزلات بكتيرية كانت تفقد نشاطها المضاد لنمو النوع البكتيرى المرضى عند معاملة راشح نموها باى من الانزيمات الببسين أو التربسين أو البروتينيز ك مما يدل على الطبيعة البروتينية (ببتيد) للمادة المثبطة. كما لوحظ أن أعلى قدرة للمواد المثبطة على تثبيط نمو المكورات العنقودية الذهبية كانت على درجة حموضة 3-4.

التعريف الوراثى للعزلات القادرة على أنتاج مواد مضادة لنمو الميكروب العنقودى الذهبى

تم التعرف وراثيا على عدد 8 عزلات من بكتيريا حامض اللاكتيك الأكثر قدرة على تثبيط *Staphylococcus aureus* وذلك بدراسة تتابع النيوكليتدات لجين 16S r-DNA. وكان تعريفها كما يلى:

Lactobacillus plantarum strain FFNL593
Lactobacillus plantarum strain FFNL158
Lactobacillus plantarum strain FFNL188
Lactobacillus plantarum strain FFNL190
Enterococcus faecium strain FFNL 417
Lactobacillus plantarum strain FFNL 94
Lactobacillus plantarum strain FFNL 739
Lactobacillus plantarum strain FFNL1810

وقد تم تقييم مدي سلامة هذه السلالات لأستخدمها فى صناعة بعض النتجات اللبنية وذلك من حيث قدرتها على تحليل كل من الجيلاتين والحامض النووى والدم وانتاج الهستامين وتقدير مدى مقاومتها للمضادات الحيوية المختلفة. وقد اشارت النتائج إلى عدم قدرة هذه السلالات على تحليل أى من الجيلاتين والحامض النووى والدم و لم تبدى اى منها القدرة على انتاج الهستامين. كما ان هذه السلالات لم تظهر مقاومة للمضادات الحيوية المختبرة.

تقييم تاثير بعض السلالات التابعة لبكتيريا حامض اللاكتيك على تثبيط نمو المكورات العنقودية الذهبية فى الجبن المشابهة للجبن الدمياطى

تم دراسة قدرة السلالتين *Lactobacillus plantarum* FFNL1810, FFNL 739 علي تثبيط المكورات العنقودية الذهبية فى الجبن المشابهة للجبن الدمياطى. وتم اختيار هاتين السلالاتين بناء على قدرتهما العالية على تثبيط المكورات العنقودية الذهبية. وقد تم صناعة الجبن الدمياطى المشابة باستخدام مخلوط من اللبن الفرز المجفف، بروتينات لبن مركزة (70 %) ومجففة، زبدة،) تم استراجعة بالماء. وتم صناعة الجبن المشابه من هذا المخلوط عقب تجنيسه وبسترته باتباع الخطوات التقليدية فى صناعة الجبن الدمياطى (وذلك باتباع بروتوكول صناعة الجبن الدمياطى بالطريقة المحسنة). وفى هذه الطريقة تم تقسيم المخلوط المعد من المكونات سالفة الذكر الى جزئين تم اضافة بادئ يوغورت تجارى لاحدهما بينما أضيفت كمية الملح الكلية للجزء الاخر. والجزء المضاف إليه البادئ استخدم لأجراء المعاملات الثمانية التالية:

المعامل C^-: كونترول (لأضافة لاى من سلالات *Lactobacillus plantarum* او الميكروب العنقودى الذهبى)

المعاملة LB1: أضافة للسلالة *Lactobacillus plantarum* FFNL1810 بتركيز 10^6 /مل

المعامله LB2: أضافة للسلالة *Lactobacillus plantarum* FFNL739 بتركيز 10^6 /مل

المعامله LBM: أضافة للسلالتين (بنسبة 1:1) FFNL739 ، *Lactobacillus plantarum* FFNL1810) بتركيز اجمالى للسلالاتين 10^6 /مل

المعاملة SC^+: أضافة الميكروب العنقودى الذهبى (بتركيز 10^5 /مل)

المعاملهSLB1: أضافة للسلالة *Lactobacillus plantarum* FFNL1810 (10^6/مل) والميكروب العنقودى الذهبى (10^5 /مل)

المعامله SLB2: أضافة السلاله *Lactobacillus plantarum* FFNL739 (10^6 /مل) والميكروب العنقودى الذهبى (10^5 /مل)

المعامله SLBM: أضافة للسلالتين (بنسبة 1:1) *Lactobacillus plantarum* FFNL1810, FFNL739 (بتركيز اجمالى 10^6 /مل) وأضافة الميكروب العنقودى الذهبى (10^5 /مل)

وتركت المخاليط المختلفة لمدة ساعة على 40 م° ثم خلطها بكميات مساوية من المخلوط المحتوى على الملح. وتركت المخاليط على 40م° حتى تمام التجبن. وعقب التجبن تم حفظ الجبن لمدة 56 يوما على درجة حرارة 6±1 م°. وتم

اجراء التحاليل الميكروبيولوجية والكيماوية والتقييم الحسى للاجبان المصنعة (من مخاليط لا تحتوى على الميكروب العنقودى الذهبى) بعد التصنيع مباشرة وبعد 14، 28، 56 يوما من التخزين.

أولا: التركيب الكيميائى للجبن الدمياطى المشابه

أشارت النتائج إلى:

- انه لا توجد فروق معنوية فى محتوى أجبان المعاملات المختلفة من البروتين، الرماد، الملح، الدهن وذلك فى العينات التى تم تحليلها مباشرة عقب التصنيع.
- لاتوجد فروق معنويه فى قيم الحموضه بين الاجبان المختلفه فى بدايه فتره التخزين، فى حين ان قيم الاس الهيدروجينى كانت تشير الى حدوث انخفاض معنوى ($P < 0.05$) فى معاملات الجبن LB1 وLBM المحتويه على السلاله FFNL1810 و ذلك مقارنة بالمعامله الكنترول C و تلك المحتوية على السلالة FFNL1810 مما قد يشير الى قدرة هذه السلاله على انتاج الحامض. ومن جهة اخرى لوحظ زيادة تدريجية فى قيم الحموضة يصاحبها انخفاض تدريجى فى قيم pH لجميع المعاملات وذلك بالتقدم فى زمن حفظ الجبن الدمياطى المشابه.
- اضافه سلالات *Lactobacillus plantarum* الى مشابه الجبن الدمياطى لم يكن لها تاثير معنوي على المحتوى الرطوبي للاجبان المختلفه. وأثناء التخزين انخفض المحتوى الرطوبي فى جميع المعاملات تدريجيا و ذلك بالتقدم فى زمن التخزين.
- أضافه سلالات *Lactobacillus plantarum* أدت الى حدوث زيادة معنوية فى نسبه البروتين الذائب فى الماء فى أجبان المعاملات LB1 وLB2 وLBM. وكانت عينات الجبن المحتويه على السلاله FFNL1810 أعلى فى محتواها من البروتين الذائب فى الماء مقارنة بتلك العينات المحتويه على السلالة FFNL739 اوالمعامله الكنترول. وقد يشير الى قدره السلاله FFNL 1810 على تحليل بروتينات اللبن بقدر اعلى من السلاله FFNL739.
- فى بداية التخزين لم يتاثر محتوى الاجبان المختلفة من الأحماض الدهنية الطيارة بأضافة سلالات *Lactobacillus plantarum* . وبعد 56 يوما من التخزين بدت الاختلافات فى محتوى الاحماض الدهنيه الكليه الطياره اكثر وضوحا. وظهر اعلى تركيز من الاحماض الدهنيه الطياره فى عينات الجبن المحتوية على السلالة FFNL1810 . بينما عينات الجبن المحتويه على السلاله FFNL739 فقد كانت تحتوى على تركيز من الاحماض الدهنيه الطياره مماثلا لذلك المتواجد بالعينه الكنترول.
- التغيرات الكيماويه السالف ذكرها تم رصدها أيضا فى مجموعة الاجبان المضاف اليها الميكروب العنقودى الذهبى.

ثانيا: التغيرات الميكروبية للجبن الدمياطى المشابه

اشارت النتائج الى:

الأعداد الكلية من البكتريا فى بداية التخزين تراوحت بين الاجبان المختلفه كان يتراوح (10^6 –10^7) خليه / جبن. اظهرت المعاملات المحتويه على السلاله FFNL739 انخفاض معنويا فى الاعداد الكليه للبكتريا خاصه مع زياده فتره التخزين وذللك مقارنه بالعينه الكونترول.

حدوث انخفاض معنوى ($P<0.05$) فى الاعداد الحيه من الميكروب العنقودى الذهبى فى الاجبان المضاف اليها احد سلالتي *Lactobacillus plantarum* اوخليطهما. وتراوح الانخفاض فى الاعداد الحيه من الميكروب العنقودى الذهبى بين 0.9 –1.6 لوغاريتم**10** خليه /جم جبن. وأستمر هذا التأثير المثبط طوال فترة التخزين.

الاعداد الحية المقدره من اى من سلالتى *Lactobacillus plantarum* فى بدايه فتره التخزين تراوحت بين 6.2–6.8 لوغاريتم 10 خليه/ جم جبن. و لوحظ انخفاض تدريجى ($P<0.05$) فى الاعداد الحيه فى كلا السلالتين مع التقدم فى زمن التخزين وكان اكثر وضوحا فى حاله اعداد السلاله FFNL739 مقارنة بالسلاله FFNL 1810 .

عدم تسجيل اعداد حيه من بكتيريا الكوليفورم فى أى من الأجبان المصنعة و ذلك خلال فترة التخزين.

ثالثا: التقييم الحسى

اشارت نتائج التقييم الحسي للاجبان المختلفه الى وجود تحسن ($P<0.05$) فى الصفات الحسيه من حيث (القوام، الطعم والقبول العام) للأجبان المحتويه على اى من سلالتى *Lactobacillus plantarum* أو خليطهما وذلك مقارنه بالكنترول. ولقد حدث انخفاض تدريجى فى قيم التقيم الحسي بزياده فتره التخزين مع احتفاظ الاجبان المحتويه على *Lactobacillus plantarum* بافضليتها مقارنه بالجبن الكنترول.