بررسی زنده مانی و تأثیر *لاکتوباسیلوس کازئی* LAFTI-L26 به عنوان کشت الحاقی بر ویژگی های کیفی پنیر قرمز هلندی

سیّدرضا ابوطالبی کهنه شهری، صابر امیری[۲*]، مینو ایلخانی پور[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، موسسه آموزش عالی صبا، ارومیه
۲- دانشجوی دکترای تخصصی بیوتکنولوژی مواد غذایی گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
۳- استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه، ارومیه

(تاریخ دریافت: ۹۶ /۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۹/۰۵)

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی زنده مانی باکتری *لاکتوباسیلوس‌کازئی* LAFTI-L26 در پنیر قرمز هلندی می‌باشد. برای این منظور اثر تیمارهای حرارتی (پاستوریزاسیون و غیر پاستوریزاسیون)، در غلظت های مختلف آب نمک (۵ درصد، ۲/۵ درصد وصفر درصد)، زمان آب نمک گذاری (۱، ۲ و ۳ روز) و مدت زمان رسیدن (۱، ۳۰ و ۶۰ روز) بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس‌کازئی* و خصوصیات فیزیکو شیمیایی پنیر از قبیل pH، ماده خشک، درصد چربی، درصد نمک و اسیدیته مطالعه شد. نتایج نشان داد، پس از گذشت ۶۰ روز از دوره رسیدن pH پنیرها (پاستوریزه و غیره پاستوریزه) به طور معنی داری افزایش یافت ($p<0.05$). در طی دوره رسیدن چربی پنیرهای غیره پاستوریزه به طور معنی داری افزایش یافت ($p<0.05$). بار میکروبی کل در طی دوره نگهداری به طور معنی داری افزایش یافت ($p<0.05$). اسیدیته پنیرها در طی نگهداری به طور معنی داری کاهش یافت($p<0.05$) و همچنین با افزایش مدت آب نمک گذاری در پنیرهای غیره پاستوریزه به طور معنی داری افزایش یافت ($p<0.05$). فرایند حرارتی (پاستوریزاسیون) موجب کاهش درصد نمک نمونه‌ها به طور معنی داری شد ($p<0.05$). با افزایش دوره رسیدن تعداد باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در تمامی نمونه‌ها به طور معنی داری افزایش یافت($p<0.05$)، و پاستوریزاسیون موجب افزایش زنده مانی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* شد. با افزایش درصد آب نمک زنده مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* در پنیر *پاستوریزه* به طور معنی داری افزایش یافت($p<0.05$). به طور کلی بر اساس نتایج به دست آمده پنیر قرمز هلندی تولید شده در شهرستان سلماس حامل مناسبی برای باکتری *لاکتو باسیلوس کازئی* (LAFTI-L26 DSL) بود.

کلید واژگان: *لاکتو باسیلوس کازئی*، پنیر قرمز هلندی، زنده مانی

* مسئول مکاتبات: s.amiri@tabrizu.ac.ir

۱- مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های غیربیماریزایی هستند که اگر به تعداد کافی و به صورت زنده مورد استفاده قرار گیرند، از راه ایجاد تعادل میکروبی در روده، اثرات مفید و سلامت بخشی بر میزبان خود اعمال می‌نمایند، به همین دلیل جزء غذاهای فرا سودمند محسوب می‌شوند [۲و۳]. براساس تعریف سازمان بهداشت جهانی به میکرارگانیسم‌های زنده‌ای که بتوانند پس از خورده شدن به تعداد کافی برابربا 10^7 cfu/g به روده کوچک رسیده و درآنجا مستقر شوند و خصوصیات سلامت افزای خود را بروز دهند، باکتری پروبیوتیک اطلاق می‌شود [٤]. شواهد حاکی از آن است که مصرف باکتری های اسید لاکتیک دارای مزایای بالقوه سلامتی است [٥]. باکتری‌های اسید لاکتیک به ویژه *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌ها*، به طور عادی جزئی از اکوسیستم دستگاه گوارش هستند و پروبیوتیک محسوب می‌شوند [٦]. *لاکتوباسیلوس کازئی* یکی از انواع پروبیوتیک‌ها است که کاربرد وسیعی در فرآورده‌های لبنی دارد و زنده مانی این باکتری بیشتر از سایر گونه‌هاست. *لاکتوباسیلوس کازئی* یک باکتری گرم مثبت، مزوفیل، هموفرمنتاتیو اجباری، میکروآئروفیل، کاتالاز منفی و فاقد اسپور بوده و ظرفیت بالایی درتولید اسید دارد. در مطالعات متعدد اثرات سودمند آن از جمله مقاومت به اسید معده و نمک های صفراوی، قدرت چسبندگی به سلول‌های مخاط روده، مهار فعالیت باکتری‌ها و تولید مواد ضد میکروبی به اثبات رسیده است [۷و۸]. از آنجا که برخی سویه‌های *لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس* و *لاکتو باسیلوس کازئی* در مطالعات گذشته به عنوان عوامل مؤثر در ممانعت از رشد تومورهای پیوندی در مدل‌های تجربی حیوانی شناخته شده‌اند [۹و۱۰]. *لاکتو باسیلوس کازئی* خاصیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌هایی نظیر *اشریشیا کلی*، *استافیلو کوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* داشته و همچنین نسبت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین و آمپی سیلین مقاوم است [۱۱]. بنابراین، استفاده از این باکتری اسید لاکتیک به عنوان مکمل‌های غذایی به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته و علاقه به استفاده از آن جهت تولید محصولات پروبیوتیک در حال رشد است [۱۲]. *لاکتوباسیلوس کازئی* با توجه به پتانسیل ویژه‌ای که در مقابله با عفونت‌های ویروسی و باکتریایی دارد، به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۳]. به طوری که پژوهش‌ها نشان می‌دهد که این باکتری باعث کاهش التهاب و آسیب کبدی می‌شود [١٤]. همچنین مشخص شده است که باکتریوسین جداسازی شده از *لاکتوباسیلوس کازئی* بر روی قدرت چسپندگی و تشکیل بیوفیلم سویه‌های *سودوموناس* جدا شده از بیماران دارای عفونت ادراری اثر داشته و تا حد بسیار زیادی از تشکیل بیوفیلم جلوگیری می‌کند [١٥].

پنیر قرمز هلندی پنیر نیمه سختی است که منشأ آن کشور هلند است این پنیر به طور سنتی به شکل استوانه‌های گرد که داخل آن به شکل زرد کم رنگ و دارای پوشش یا پوستی از پارافین قرمز رنگ است به فروش می‌رسد. این‌پنیرمانده‌گاری خوبی نسبت به دیگر پنیرها دارد و همین ویژگی موجب شد که از قرن چهاردهم تا هیجدهم محبوب ترین پنیر هم در اجتماعات موجود در دریاها و هم خشکی‌ها باشد [١٦]. با توجه به اینکه تا کنون مطالعه‌ای بر روی پنیر قرمز هلندی صورت نگرفته است، هدف پژوهش حاضر افزودن باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* به این پنیر جهت بررسی زنده مانی آن و همچنین بررسی اثر کشت الحاقی پروبیوتیک و فرآیند حرارتی اعمال شده در فرآوری پنیر بر ویژگی های پنیر قرمز هلندی تولید شده در شهرستان سلماس است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

۷۰ لیتر شیر خام از مرکز جمع آوری شهرستان سلماس با ویژگی‌های شیمیایی زیر تهیه شد.

باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی*، DSM-LAFTI-L26 DSL - (Batch No:121815.20 ، استرالیا)، مایه پنیر میکروبی (Meito، ژاپن)، شیر پس چرخ (ساخت شرکت سیگما آلدریچ آمریکا) و پارافین خوراکی قرمز (ساخت ایران) تهیه شدند.

Table 1 Ingredients of raw milk used to cheese production

pH	Acidity (%)	Dry matter (%)	Ash (%)	Protein (%)	Fat (%)
6.44	0.142	8.34	0.64	3.19	3.2

۲-۳- آزمون های فیزیکوشیمیایی

اندازه گیری pH پنیر با pH متر [۱۷]، اندازه گیری چربی پنیر با روش ژربر [۱۸]، اندازه گیری ماده خشک با آون [۱۷]، اسیدیته اندازه‌گیری شد [۱۹] و اندازه گیری نمک با روش AOAC975.20 اندازه گیری شد [۲۰].

۲-٤- شمارش بار میکروبی کل

شمارش بار میکروبی کل با استفاده از محیط کشت Nutrient agar به صورت کشت پوپلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٤۸ ساعت انجام شد و کلنی ها شمارش شدند [۲۱].

۲-۵- شمارش *لاکتوبا سیلوس کازئی*

بررسی زنده مانی *لاکتوبا سیلوس کازئی* با استفاده از محیط کشت MRS agar و ونکومایسین به صورت کشت پورپلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت انجام شد و کلنی ها شمارش شدند [۲۲].

۲-٦- فعال سازی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی*

جهت فعالسازی مطابق دستوالعمل شرکت DSM، مقدار توصیه شده از باکتری به ۱۰۰ میلی لیتر شیر پس چرخ ۱۰ درصد (وزنی/حجمی) اضافه شده و به مدت ۲ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد [۲۳].

۲-۷- تهیه پنیر قرمز هلندی

۳۵ لیتر شیر در دمای٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شده و سپس تا دمای ۳۵ درجه سانتی گراد سرد شد. پس از اضافه کردن باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی*، مایه پنیر اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه دلمه برش داده شده و پس از آبگیری در قالب‌های مخصوص ۲ کیلوگرمی پُر شد. سپس نمونه‌ها به انبار مخصوص (دمای ۱٦ درجه سانتی گراد) منتقل شده و به مدت ۲ ساعت با وزنه ۲۵ کیلوگرمی پرس شدند. در ادامه پنیرهای تولیدی به اندازه‌های نیم کیلویی تقسیم و برای مدت زمان معین در داخل آب نمک قرار داده شده و در نهایت پس از فرو بردن در داخل پارافین خوراکی، آنها را بسته بندی کرده و در یخچال نگهداری شدند [۲٤]. برای تولید پنیر غیر پاستوریزه، ۳۵ لیتر شیرخام را در ظرف ریخته و سپس باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* اضافه گردید (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد) سپس ادامه مراحل تولید پنیر غیره پاستوریزه عیناً مطابق روش بالا تکرار شد [۲٤].

۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری

فاکتورهای مورد مطاله در پژوهش حاضر عبارتند از فرآیند حرارتی شیر (شامل پاستوریزاسیون و غیر پاستوریزاسیون)، آب نمک گذاری (صفر درصد، ۵/۲ درصد و ۵ درصد)، زمان آب نمک گذاری (یک، دو و سه روز) و زمان رسیدگی (۱ تا٦۰ روز) بود که با استفاده از طرح فاکتوریل جزئی مورد مطالعه قرار گرفت. طرح شامل ۱٤ نمونه بود که با استفاده از آنالیز واریانس در سطح خطای ۰۵/۰= α مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت، آنالیز داده‌ها با نرم افزار Design Expert نسخه ۱۰ انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- زنده مانی *لاکتوباسیلوس کازئی*

جدول شماره ۲ نشان دهنده تجزیه و تحلیل آماری نتایج زنده مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* است که اثر متغیرهای مستقل معنی دار بر زنده مانی را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۱ (A) و (B)، به ترتیب با افزایش درصد آب نمک و مدت زمان آب نمک گذاری زنده مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* در پنیرهای پاستوریزه به طور معنی افزایش یافت و با افزایش درصد آب نمک و مدت زمان آب نمک گذاری زنده مانی *لاکتو باسیلوس کازئی* در پنیرهای غیره پاستوریزه کاهش یافت ($p<0.05$).

لاکتوباسیلوس کازئی سبب افزایش میزان پپتیدهای کوتاه زنجیر، اسیدهای آمینه آزاد و اسیدهای چرب آزاد در پنیر می شوند [۲۵]. با این حال دوره رسیدگی تاثیر معنی داری در افزایش جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک (*لاکتوباسیلوس کازئی*) داشت. میزان نرخ کاهش باکتری‌های اسید لاکتیک در طول دوره رسیدگی به عواملی نظیر حساسیت کشت آغازگر به نمک، فعالیت آبی و توانایی اتولیز سویه‌ها وابسته است [۲۶]. با توجه به شکل ۱ (C) با افزایش دوره رسیدگی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس‌کازئی* به طورمعنی داری برای هر دو نوع پنیر (پاستوریزه و غیر پاستوریزه) افزایش یافت($p<0.05$). لاکتوباسیل‌ها به محیط پیچیده‌ای حاوی اسیدهای آمینه زیاد، کربوهیدرات‌های قابل تخمیر، ویتامین‌ها و فاکتورهای رشد نیاز دارند [۲۷]. به طور مثال گونه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ترکیب اصلی و فلور غالب غیر آغازگر در بسیاری از انواع پنیرها از جمله چدار، امنتال، سرادا استرلا، فیوره و ساردو گزارش شدند [۲۸]. همچنین لازم به ذکر است که نوع بسته بندی نیز عامل مهمی در میزان زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک در فراورده‌های لبنی به شمار می‌رود. مطالعات نشان دادند که باکتری‌های پروبیوتیک شرایط بی هوازی یا میکروآئروفیل را برای زنده ماندن ترجیح می‌دهند، لذا در مواجهه با اکسیژن ممکن است سبب کاهش ماندگاری آن ها شود. ورود اکسیژن سبب انجام واکنش بین اکسیژن و آب شده و رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند سوپراکسید و پراکسید هیدروژن تولید می‌شوند، این رادیکال‌ها به پروتئین، لیپید و اسیدهای نوکلئیک حمله کرده و سبب از بین رفتن باکتری‌ها می‌گردند [۲۹]. بر اساس گزارشات بدست آمده در طول فرآیند تخمیر پنیر، متابولیت‌های متنوعی نظیر لاکتات، سیترات، گلیسرول و اسیدهای آمینه تولید شده که به خوبی توسط لاکتوباسیلوس‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند [۳۰]. این باکتری‌ها نقش اساسی در تولید غذاهای تخمیری نظیر سبزیجات، گوشت و به ویژه محصولات لبنی تخمیری دارند، مطالعات انجام شده تنوع زیستی این جنس‌ها را در پنیر نشان داده است [۳۱]. البته، زنده مانی پروبیوتیک‌ها علاوه بر pH و اسیدیته تحت تاثیر عواملی مانند پتانسیل اکسیداسیون و احیاء نیز می‌باشد [۳۲]. امروزه مصرف کنندگان علاوه بر توجه به ارزش تغذیه‌ای غذای مصرفی خود برای خواص سلامت بخش آن نیز اهمیت قائل هستند. چنین خصوصیتی را می‌توان در غذاهای سین‌بیوتیک یافت که به صورت هم زمان دارای باکتری‌های پروبیوتیک و ترکیبات پری بیوتیک می‌باشند [۳۳].

Table 2 Analysis of variance table of heat treatment, brine (Salt percent), brining time (day) and ripening (day) on survival of *L. casei*

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	2.19	3	0.73	10.52	0.0038	significant
D-Ripening (day)	0.85	1	0.85	12.18	0.0082	
AB	0.85	1	0.85	12.18	0.0082	
AC	0.5	1	0.5	7.2	0.0278	
Curvature	0.66	2	0.33	4.77	0.0433	significant
Residual	0.56	8	0.069			
Lack of Fit	0.17	4	0.042	0.44	0.7771	not significant
Pure Error	0.39	4	0.097			
Cor Total	3.41	13				
Std. Dev.	0.26	R-Squared	0.7977			
Mean	8.51	Adj R-Squared	0.7219			

A: Heat treatment, B: Brine (%), C: Brining time (day), D: Ripening (day)

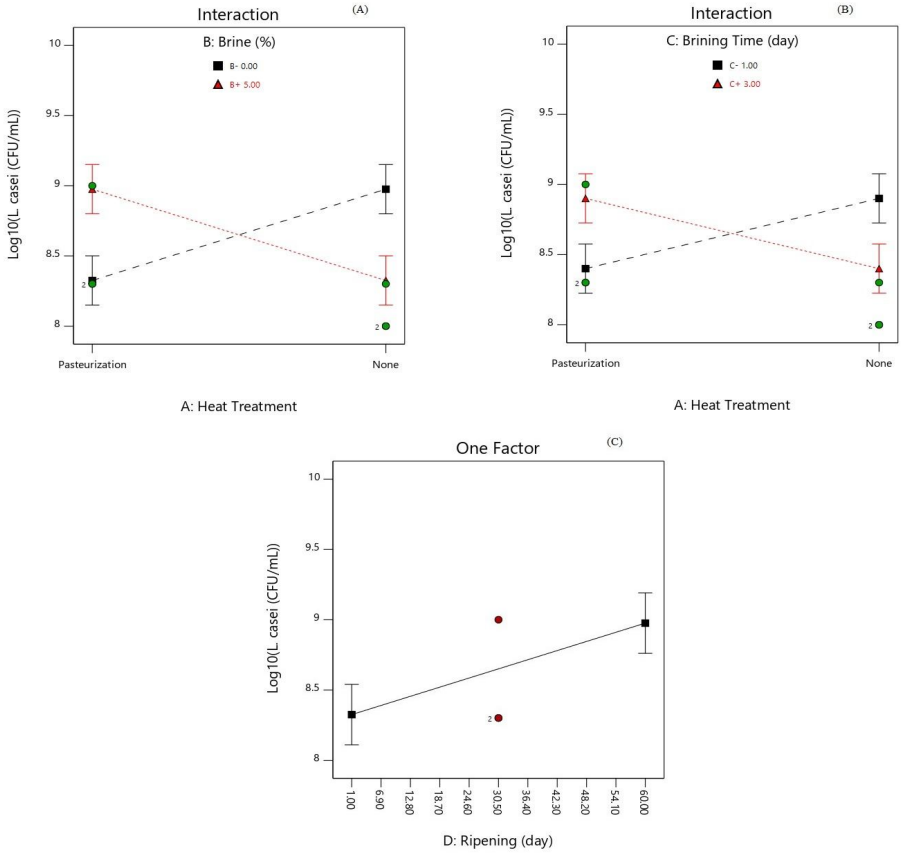

Fig 1 The effect of (A) Heat treatment and brining (Salt percent) interaction, (B) Heat treatment and brining time interaction, (C) Ripening day on survival of *L. casei*

۳-۲- تغییرات بار میکروبی کل

با توجه به شکل ۲ (A) تأثیر متقابل درصد آب نمک گذاری و فرایند حرارتی بر بار میکروبی پنیرهای پاستوریزه و غیر پاستوریزه تأثیر معنی داری داشته‌اند ($p<0.05$). باید به این نکته اشاره کرد که میکروارگانیسم‌های زیادی مانند فلور میکروبی در پنیر وجود دارند که طی رسیدن، مقدار و محصولات تولیدی از آنها تغییر می‌کند [۳٤]. تعداد بالای میکروارگانیسم ها در روزهای اول احتمالاً به رشد سریع میکروارگانیسم‌ها در طی مراحل اولیه انبارداری و یا به دلیل میزان بالای کلی فرم وابسته است درحالیکه کاهش میزان با کتری‌ها در طول دوره رسیدگی احتمالاً به دلیل ایجاد شرایط مطلوب برای باکتری‌های اسید لاکتیک و افزایش میزان اسید لاکتیک، قابل توجیه است که می‌تواند مانع از رشد سایر میکروارگانیسم‌ها شود [۳۵]. با توجه به شکل ۲ (B) با افزایش دوره رسیدن بار میکروبی پنیرهای پاستوریزه و غیره پاستوریزه به طور معنی داری افزایش یافته است که مربوط به اواخر انبار داری است ($p<0.05$).که احتمالاً مربوط به باکتری های اسید لاکتیک است. نتایج اونی و همکاران (2008)، نیز نشان دادند که شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در پنیر سنتی گیبنا از روز ۱ تا ٦۰ افزایش یافت ولی بعد از آن و تا رسیدن به روز ۲٤۰ شمارش باکتری‌ها روند کاهشی تدریجی را نشان دادند. افزایش شمارش کلی باکتری‌ها احتمالاً به رشد سریع میکروارگانیسم‌ها در طی مراحل اولیه انبار داری مربوط می‌شود [۳٦]. با توجه به شکل ۲ (C) با افزایش دوره رسیدن بار میکروبی کلی پنیرها (هر دو نوع پنیر) به طور معنی داری افزایش یافته است($p<0.05$). میان این گروه عظیم میکروارگانیسم‌ها برهم کنش‌های متعددی رخ می‌دهد، به عنوان مثال برخی از آن ها با تجزیه پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و ویتامین‌ها، ترکیباتی را تولید می‌کنند که برای رشد دسته دیگری از میکروارگانیسم‌ها ضروری است [۳۷].

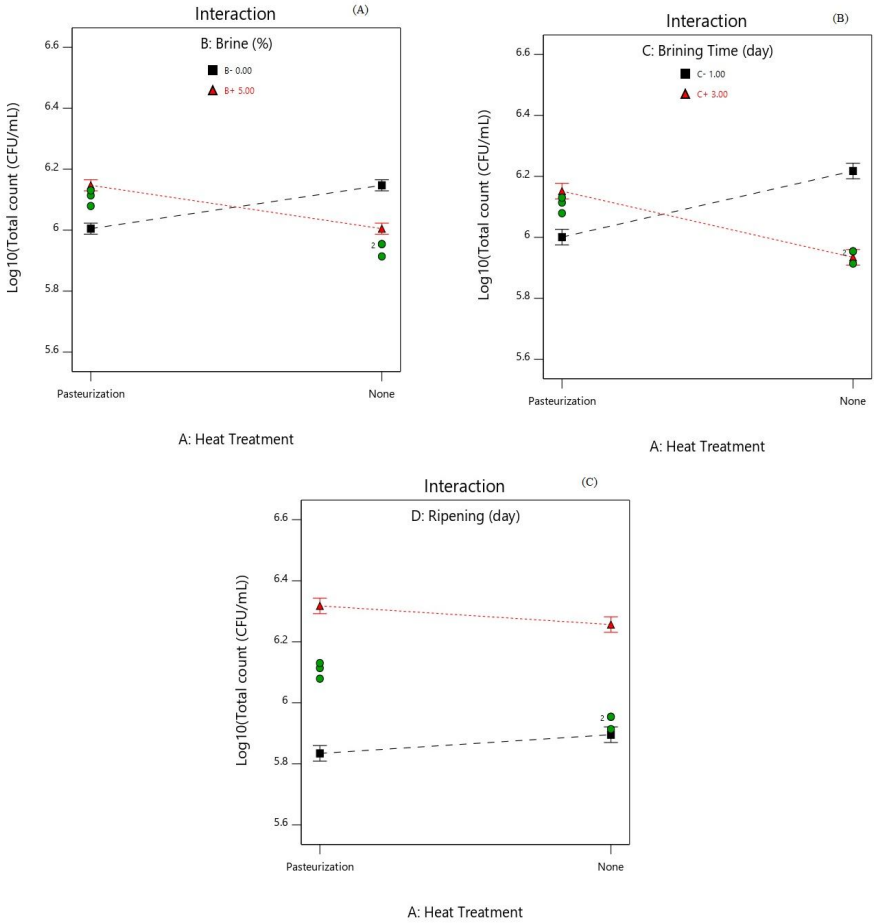

Fig 2 The effect of (A) Heat treatment and brining (Salt percent) interaction, (B) Heat treatment and brining time interaction, (C) Heat treatment and ripening day interaction on total microbial count

۳-۳-تغییرات pH

با توجه به شکل ۳، pH نمونه‌ها با افـزایش دوره نگهـداری به طور معنی داری افزایش یافت ($p<0.05$). تغییرات pH تا حد زیادی مربوط به تخمیر لاکتوز و افزایش اسیدیته می‌باشد، همچنین این تغییرات تحت تأثیر مواد بـافری موجـود در پنیـر می‌باشند [۳۸]. واسیلیادیس (۲۰۰۹) بیان کردند که افزایش pH ممکن است به دلیل عمل پروتئولیز در طـول نگهـداری باشـد. پروتئولیز با آزاد ساختن گروه‌های آمـین اسـیدهای آمینـه، pH محصول را طی دوره نگهداری افزایش می‌دهد [۳۹]. از طرفی دیگر، در اواخر دوره رسیدن، ممکن است به دلیل مصرف اسید لاکتیک توسط کپک‌هـا و مخمرهـا و همچنـین انجـام فرآینـد پروتئولیز که در طی رسیدن اتفاق می‌افتد و تولید میزان بـالای ترکیبات قلیایی (اسیدهای آمینه و آمونیاک)، pH پنیر افـزایش می‌یابد [٤٠].

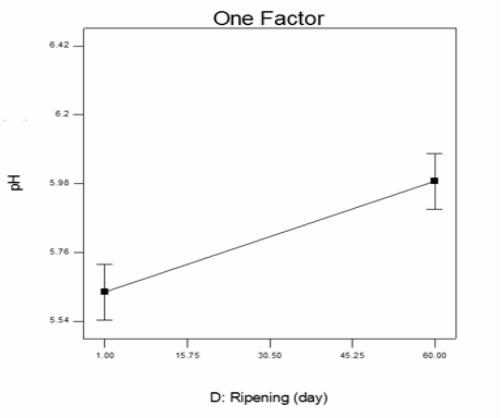

Fig 3 The effect of ripening day on pH

۳-٤-درصد ماده خشک

با توجه به شکل ٤ (A) تأثیر متقابل فرایند حرارتی و افـزایش درصد آب نمک موجب کاهش معنـی داری بـر درصـد مـاده خشک شد($p<0.05$). مطابق نتایج تأثیر درصد آب نمـک بـر ماده خشک پنیرها به طور معنی داری می‌باشد ($p<0.05$). کـه

با افزایش نمک ماده خشک کاهش می‌یابد. با افزایش درصد آب نمک رطوبت افزایش و ماده خشک کاهش یافته است. یکی از عوامل مؤثر در تغییرات درصد رطوبت، آبگیری پروتئین‌ها می‌باشد. هرچه گروه‌های قطبی در یک ماتریکس پروتئینی بیشتر باشد، میزان آبگیری بیشتر خواهد بود. با توجه به اینکه پروتئولیز با آزاد ساختن گروه‌های قطبی مثل آمین و کربوکسیل اسیدهای آمینه و پپتیدها باعث افزایش قابلیت حل شدن و جذب آب پروتئین‌ها می‌شود، لذا هر چه شدت بالا باشد به علت جذب آب بیشتر، درصد رطوبت نمونه‌های مختلف افزایش یافته و درصد ماده خشک کاهش می یابد [۴۳]. طبق شکل ٤ (A) با افزایش درصد آب نمک، ماده خشک در پنیرهای پاستوریزه و غیره پاستوریزه کاهش یافت. مهمترین تأثیر فرآیند حرارتی مربوط به تشکیل کمپلکس‌های حرارتی بین پروتئین های آب پنیر و کازئین‌ها است. به این ترتیب که اعمال فرآیند پاستوریزاسیون باعث تغییر ماهیت β – لاکتوگلوبولین و تشکیل کمپلکس بین مولکول‌های β– لاکتوگلوبولین، α- لاکتالبومین و K- کازئین از طریق پیوندهای دی سولفیدی می‌گردد [٤١]. تشکیل کمپلکس های حرارتی به دلیل نگه داشتن پروتئین‌های بیشتر در داخل دلمه، بازده تولید پنیر را افزایش می‌دهد،تحقیقات انجام گرفته نشان می‌دهد که در فرآیند تولید پنیراز شیر خام بالغ بر ۱۰ تا ۲۵ درصد پروتئین‌های شیر به صورت پروتئین‌های آب پنیر از دلمه پنیر خارج می‌شوند. درصورتی که با حرارت دادن شیر می توان پروتئین‌های سرمی را به کازئین‌ها متصل نمود و به این ترتیب بازده پنیرسازی را افزایش داد. به علاوه پروتئین‌های سرمی به دلیل هیدروفیل بودن، موجب می‌شوند رطوبت بیشتری در دلمه باقی بماند و بازده تولید پنیر افزایش یابد [۱]. که ما به این نتیجه می‌رسیم که در طی رسیدن آب آزاد می‌کنند و درصد ماده خشک کاهش یابد. با توجه به شکل ٤ (A) افزایش درصد آب نمک در پنیرهای غیر پاستوریزه باعث کاهش اندک ماده خشک این پنیرها در طول افزایش درصد آب نمک است. در شیر غیر پاستوریزه پروتئین‌ها به کازئین متصل نمی‌شوند و مقدار کاهش ماده خشک در طول نگهداری کم است [۱]. هرچه گروه‌های قطبی در شبکه پروتئینی بالا باشد میزان جذب آب بالا خواهد بود. در نتیجه میزان ماده خشک پایین می‌آید [٤٢]. نتایج بدست آمده در این پژوهش با نتایج محمد عبداله و ابراهیم احمد (۲۰۱۰) به این نتیجه رسیده‌اند که پاستوریزاسیون باعث کاهش ماده خشک می‌شود [۲۲]، که با نتایج ما در این پژوهش مطابقت دارد. با توجه به شکل ٤ (A)، تأثیر فرآیند حرارتی را برمقدار ماده خشک را در پنیرهای پاستوریزه و غیر پاستوریزه نشان می‌دهد، که ماده خشک پنیرهای غیر پاستوریزه به طور معنی داری ($p<0.05$) بیشتر از پنیرهای پاستوریزه بود.

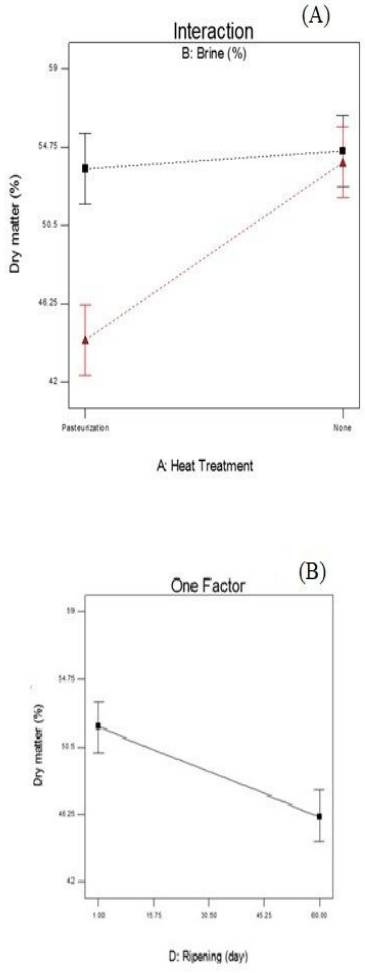

Fig 4 The effect of (A) Heat treatment and brining (Salt percent) interaction, (B) Ripening day on dry matter

یکی از عوامل مؤثر در تغییرات ماده خشک، آبگیری پروتئین‌ها می‌باشد. هرچه گروه‌های قطبی در یک ماتریکس پروتئینی بیشتر باشد، میزان آبگیری بیشتر بوده و در نتیجه میزان ماده

خشک کاهش می‌یابد. پروتئولیز با آزاد ساختن پروتئین‌ها می‌شود، لذا افزایش شدت پروتئولیز موجب جذب آب بیشتر و کاهش ماده خشک پنیر می‌گردد [۳۸]. مطابق شکل ٤ (B) تغییرات درصد ماده خشک در را طی دوره رسیدن به طور معنی داری کاهش می‌یابد ($p<0.05$). بطور معمول کاهش ماده خشک به شکسته شدن باندهای پپتیدی، آزاد سازی گروه‌های یونی جدید و افزایش قابلیت جذب آب توسط پروتئین‌ها مربوط می‌شود. لذا هر چه شدت پروتئولیز بالا باشد، گروه‌های قطبی در ماتریکس پروتئولیز بیشتر شده و به علت جذب آب زیاد، رطوبت پنیرها افزاش می‌یابد [۳۹].

۳-۵-درصد اسیدیته

بر اساس شکل ۵ تأثیر فرآیند حرارتی بر درصد اسیدیته (بر حسب اسید لاکتیک) و تأثیر متقابل فرایند حرارتی و مدت زمان آب نمک گذاری بر درصد اسیدیته معنی داری بوده‌اند($p<0.05$).

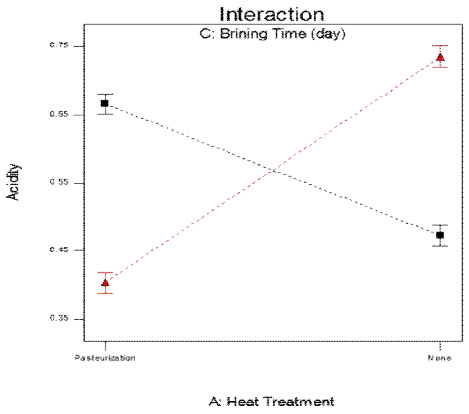

Fig 5 The effect of heat treatment and brining time interaction on acidity

مطابق نتایج درصد اسیدیته پنیرهای غیر پاستوریز به طور معنی داری بیشتر از پنیرهای پاستوریزه بود ($p<0.05$). این امر می‌تواند به دلیل میزان پروتئین و ظرفیت بافری بالاتر، بالاتر بودن میزان نمک و در نتیجه جلوگیری از فعالیت بیشتر باکتری‌های اسید لاکتیک و در نتیجه تولید اسید و نیز ارتباط بین کاهش اسیدیته و افزایشpH به دلیل تولید ترکیبات آلکالین (اسیدهای آمینه) باشد و نتایج ما با نتایج احسانی و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت دارد [٤٤]. با توجه به شکل ۵ در طی مدت زمان آب نمک گذاری با افزایش مدت زمان آب نمک گذاری درصد اسیدیته در پنیرهای پاستوریزه به طور معنی داری کاهش یافت ($p<0.05$)، ولی در پنیرهای غیر پاستوریزه به طور معنی داری افزایش یافت ($p<0.05$). این امر می‌تواند به دلیل میزان بالاتر بودن میزان نمک پنیر پاستوریزه و در نتیجه جلوگیری از فعالیت بیشتر باکتری‌های اسید لاکتیک باشد [٤٠]. افزایش سطح نمک ارتباط مستقیم با افزایش pH دارد که این می‌تواند در نتیجه کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه کاهش اسید لاکتیک تولیدی در غلظت‌های بالای نمک باشد [٤٣].

۳- ٦- درصد چربی

با توجه به شکل ٦ (A) در طی دوره رسیدن درصد چربی در پنیرهای غیر پاستوریزه و پاستوریزه به طور غیره معنی داری افزایش یافته است ($p>0.05$). پاستوریزاسیون به علت اتصال پروتئین‌های سرمی منعقد شده با گلبول‌های چربی، بازیافت چربی در پنیرهای تهیه شده از این شیرها نسبت به شیرخام بیشتر می‌باشد [٤٥]. هم چنین باقی ماندن لیپاز طبیعی در پنیرهای تهیه شده از شیرخام، دلیل دیگر این امر می‌باشد. در حالی که این آنزیم، حین فرآیند پاستوریزاسیون غیرفعال می‌شود [٤٦]. در توجیه این مسئله می‌توان گفت که حین فرآیند پاستوریزاسیون به علت اتصال پروتئین‌های سرمی منعقد شده با گلبول‌های چربی، بازیافت چربی در پنیرهای تهیه شده از این شیرها نسبت به شیرخام بیشتر می‌باشد [٤٧]. درصد چربی پنیرهای غیرپاستوریزه بیشتر از پنیرهای پاستوریزه بود که نتایج ما با نتایج اسماعیل و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت داشت [٤٨]. با توجه به شکل ٦ (B) با افزایش درصد نمک چربی پنیرها به طور معنی داری کاهش می‌یابد ($p<0.05$). با کاهش مقدار چربی در پنیر، مقدار و سرعت جذب نمک در پنیر افزایش می‌یابد [٤٩]. طبق گزارش اور-رحمان و همکاران (۲۰۰۳) در مورد پنیر پیتزای کم چرب، نمونه دارای پودر پروتئین شیر و چربی کمتر، مقدار نمک بیشتری جذب نموده است، که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت داشت [۵۰].

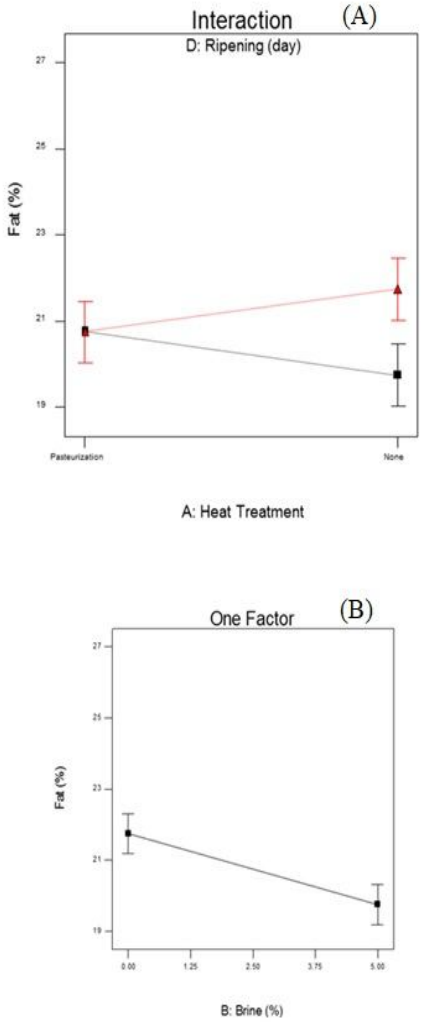

Fig 6 The effect of (A) Heat treatment and ripening day interaction, (B) Brining (Salt percent) on fat content

٤- نتیجه گیری

در پنیر پاستوریزه زنده مانی و افزایش رشد باکتری *لاکتو باسیلوس کازئی* بیشتر از پنیر غیره پاستوریزه بود و با افزایش درصد نمک در پنیر پاستوریزه موجب افزایش رشد باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* شد. با افزایش دوره رسیدن مقدار pH افزایش یافت که به خاطر آزاد شدن برخی ترکیبات قلیایی بود. چربی پنیرهای غیره پاستوریزه با افزایش دوره رسیدن افزایش یافت. بار میکروبی کل در طی دوره رسیدن افزایش یافت، با افزایش مدت نگهداری در آب نمک بار میکروبی در پنبرهای پاستوریزه کاهش ولی در پنیرهای غیر پاستوریزه افزایش یافت و در انتهای دوره رسیدن بار میکروبی پنیرهای پاستوریزه بیشتر از غیره پاستوریزه بود. اسیدیته پنیرهای پاستوریزه با افزایش مدت زمان نگهداری در آب نمک کاهش ولی در پنیرهای غیر پاستوریزه افزایش یافت و اسیدیته پنیرهای غیر پاستوریزه به طور معنی داری بیشتر از پنیرهای پاستوریزه بود. رطوبت پنیرهای پاستوریزه بیشتر از رطوبت پنیرهای غیر پاستوریزه است، رطوبت پنیرها با افزایش درصد آب نمک افزایش یافت.

٥- تقدیر و تشکر

نویسندگان بدین وسیله از زحمات فراوان سرکار خانم دکتر لعیا رضازاد باری و آقای مهندس هادی بهرامی بابت کمک‌هایشان در انجام این پژوهش تقدیر و تشکر می‌نمایند.

٦- منابع

[1] Mortazavi A, Ghods Rouhani M, and Joyandeh H. 1375. Technology of milk dairy products (Translation). Ferdowsi University of Mashhad Press.

[2] Verna, E .C., and Lucak, S. 2010. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Therapeutic advances in gastroenterology*, 3: 307-319.

[3] da Costa Baptista, I. P. N., Accioly, E., and de Carvalho Padilha, P. 2013. Effect of the use of probiotics in the treatment of children with atopic dermatitis; a literature review. *Nutricion hospitalaria*, 28: 16-26.

[4] Kimoto-Nira, H., Suzuki, C., Sasaki, K., Kobayashi, M., and Mizumachi, K. 2010. Survival of a Lactococcus lactis strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract. *International journal of food microbiology*, 143: 226-229.

[5] Wedajo, B. 2015. Lactic acid bacteria: benefits, selection criteria and probiotic potential in fermented food. *Journal of Probiotics & Health*, 3: 129-138.

[6] Singh, K., Kallali, B., Kumar, A., and Thaker, V. 2011. Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1:287-290.

[7] Mirlohi, M., Soleimanian-Zad, S., Sheikh-Zeinodin, M., and Fazeli, H. 2008. Enumeration of lactobacilli in the fecal flora of infant using two different modified de-Man Rogosa Sharpe media under aerobic and anaerobic incubation. *Pakistan Journal of Biological Science*, 11: 876-81.

[8] Mishra, V., and Prasad, D. N. 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential

Education New York pp. 239-266 and 299-304.

[22] Mohamed Abdalla, M. O., and Ibrahim Ahmed, O. 2010. Effect of heat treatment, level of sodium chloride, calcium chloride on the chemical composition of white cheese. *Research Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 5: 69-72.

[23] Florence, A. C. R., Oliveira, R. P., Silva, R. C., Soares, F. A., Gioielli, L. A., and Oliveira, M. N. 2012. Organic milk improves *Bifidobacterium lactis* counts and bioactive fatty acids contents in fermented milk. *Lwt-Food Science and Technology,* 49: 89-95.

[24] Bielecka, M. M., Cichosz, G. 2017. The influence of an adjunct culture of *Lactobacillus paracasei* LPC-37 on the physicochemical properties of Dutch-type cheese during ripening. Department of Dairy Science and Quality Management, Faculty of Food Science, University of Warmia and Mazury, Oczapowskiego 7, 10-719 Olsztyn, Poland

[25] Rotaru, G., Mocanu, D., Uliescu, M., Andronoiu, D. 2008. Research studies on cheese brine ripening. *Innovative Romanian Food Biotechnology* Vol 2.

[26] Fritzen-Freir, C. B., Muller, C. M. O., Laurindo, J. B., and Prudencio, E. S. 2009. The influence of Bifidobacterium Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. *Journal of food Engineering,* 96: 621-627.

[27] Gomes, A. M. P., and Malcata, F. X. 1999. Bifidobacterium spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, technological and therapeutical properties relvent fof use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology,* 10: 139-157.

[28] Otiose, M., Arizcun, C., Irigoyen, A., Oneca, M., and Torre, P., 2006. Effect of lactobacillus adjunct cultures on the microbiological and physicochemical characteristics of Roncal- type ewe's milk cheese. *Journal of Food Microbiology,* 23: 591-598.

[29] Granato, D., Branco, G. F., Cruz, A. G., de Assis Fonseca Faria, J., and Shah, N. P. 2010. Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 455-70.

[30] Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., and Gueg, M. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Le Lait,* 83: 269-306 .

[31] Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S., and Gueguen M. 2008. Safety probiotics. *International Journal of Food Microbiology,* 15: 109-115.

[9] Asano, M., Karasawa, E., and Takayama, T. 1986. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* (LC 9018) against experimental mouse bladder tumor (MBT-2). *The Journal of urology*, 136: 719-21.

[10] McIntosh, G. H., Royle, P. J., and Playne, M. J. 1999. A probiotic strain of *L. acidophilus* reduces DMH induced large intestinal tumors in male Sprague-Dawley rats. *Nutrition and cancer*, 35: 153-9.

[11] Xanthopoulos, V., Litopoulou Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N. 2000. Characterization of Lactobacillus isolates from infant faces as dietary adjuncts. *Food Microbiology,* 17: 205-215.

[12] Jeong, J. H., Lee, C. Y., and Chung, D. K. 2016. Probiotic lactic acid bacteria and skin health. *Critical reviews in food science and nutrition,* 56: 2331–2337.

[13] Singh, V. P., Sharma, J., Babu, S., and Rizwanulla Singla, A. 2013. Role of probiotics in health and disease: A review. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 63: 253–257.

[14] Hou, Y., Wang, L., Ding, B., Liu, Y., Zhu, H., Liu, J., Li, Y., Wu, X., Yin, Y., and Wu, G. 2010. Dietary α-ketoglutarate supplementation ameliorates intestinal injury in lipopolysaccharide-challenged piglets. *Amino Acids,* 39: 555–564.

[15] Aminnezhad, S., and Kasra-Kermanshahi, R. 2013. Effect numberof herbal extracts and metabolites of Lactobacillus on quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa*. Master Thesis Microbiology. Damghan University.

[16] Miller, L., Skinner, T., and Tsai, M. 2012. *Cheese For Dummies*. Culture Magazine, John Wiley & Sons. pp. 209-210.

[17] Ardor, Y., and Polychroniadou, A. 1999. Analysis of free fatty acids, in, Laboratory Manual for Chemical Analysis of Cheese, Publication Office of the European.

[18] AOAC. 2005. Official Method of Analysis of AOAC Intl. ^{18}th ed. Method 933.05. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.

[19] AOAC. 2005. Official Method of Analysis of AOAC Intl. ^{18}th ed. Method 947.05. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.

[20] AOAC. 2005. Official Method of Analysis of AOAC Intl. ^{18}th ed. Method 975.20. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.

[21] Benson, H. 2005. Microbiological Applications ^{9}th ed. McGraw Hill Higher

assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus. *Journal of Food Microbiology*, 126: 278-285.
[32] Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., and shah, N. P. 2006. Effect of acidification on the activity of probiotic in yogurt during cold storage. *International Dairy Journal,* 16: 1181-1189.
[33] Zomorodi, S., Aberoon, N., and Khosrowshahi Asl, A. 2015. Increase the survival of *Lactobacillus acidophilus* and improved quality properties of synbiotic yogurt using apple and wheat fibers. *Iran Journal of Food Science and Technology,* 12: 203-214.
[34] Yazdanpanah, S., Ehsani, M. R., and Mizani, M. 2014. Modeling lipolysis in acceleration of ripening of ultrafiltered-feta cheese. *International Journal of Biosciences,* 4: 309-315.
[35] Litopoulou, T. E., Tzanetakis, N., and Vafopoulou, A. 1993. Effect of the type of lactic starter on microbiological, chemical and sensory characteristics of feta cheese. *Food Microbiology,* 10: 31–41.
[36] Owni, E. I., Osman, A. O., and Hamid Omer, I. A. 2008. Effect of storage period on weight loss, chemical composition, microbiological composition and sensory characteristics of Sudanese White Cheese (Gibna Bayda). *Pakistan Journal of Nutrition,* 7:75-80.
[37] Cuffia, F., Bergamini, C., and Candioti, M. 2018. Probiotic soft sheep's cheese: evaluation of probiotic survival and its influence on proteolysis and organoleptic characteristics. *International Food Research Journal*, 25: 399-407.
[38] Foruzan, S., Khosroshahi asl, A., Taslimi, A,. Madadadloo, A., and Mashayekh, M. 2009. Study of the effects of microbial, recombinant and animal rennets on some of the qualitative properties of Iranian white cheese. *Journal of Food Science and Technology,* 6: 63-72.
[39] Vassiliadis, A., Psoni L., Nikolaou S., Arvanitis L., Tzanetakis N., and Litopoulou-Tzanetaki E. 2009. Changes in microbial populations, kind of lactic acid bacteria and biochemical characteristics of Greek traditional feta cheese during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62: 39-47.
[40] Serhan, M., Linderm, M., Hosrib, C., and Fannia, F. 2010. Changes in proteolysis and volatile fraction during ripening of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Small Ruminant Research*, 90: 75–82.
[41] Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. and Mcsweeny, P. L. H. 2000. Fundamental of cheese science. Aspen. USA. p. 638
[42] Guinee, T. P., and Fox, P.F. 1993. Cheese: chemistry, physics and microbiology, general aspects, London: Chapman and Hall. Vol. 1, pp. 257–302.
[43] Corredig, M., and Dalgleish, D. G. 1996. Effect of different heat treatments on the strong binding interactions between whey proteins and milk fat globules in whole milk. *Journal of Dairy Research,* 63: 441-449.
[44] Ehsani, A., Hashemi, M., Afshari, A., and Aminzare, M. 2018. Probiotic white cheese production using coculture with Lactobacillus species isolated from traditional cheeses. *Veterinary world*, 11: 726 –730.
[45] Corredig, M., and Dalgleish, D. G. 1996. Effect of different heat treatments on the strong binding interactions between whey proteins and milk fat globules in whole milk. *Journal of Dairy Research,* 63: 441-449.
[46] Ur-rehman, S., McSweeney, P. L. H., Banks, J. M., Brechany, E. Y., Muir, D. D., and Fox, P. F., 2000. Ripening of cheddar cheese made from blends of raw and pasteurised milk. *International Dairy journal,* 10: 33-44.
[47] Tornado, M. E., Fresno, J. M., Bernardo, A., and Sarmiento, M. R. 1995. Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese. *Le Lait* 75: 551-570.
[48] Ismail, M. M., Ammar, E. M. A. A., El-Shazly, A., Eid, M. Z. 2010. Impact of cold storage and blending different lactations of cow's milk on the quality of Domiati cheese. *African Journal of Food Science*, 4: 503 – 513.
[49] Tornado, M. E., Fresno, J. M., Bernardo, A., Sarmiento, M. R. 1995. Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese. *Le Lait,* 75: 551-570.
[50] Ur-rehman, S., Farkye, N. Y., and Yim, B. 2003. Use of dry milk protein concentrate in Pizza cheese manufactured by culture or direct acidification. *Journal of Dairy Science,* 86: 3841-3848.

Viability and efficacy *of Lactobacillus casei* LAFTI-L26 as the adjunct starter on qualitative properties of red Dutch cheese

Abotalebi Kohne shahri, S. R. [1], Amiri, S. [2*], Ilkhanipour, M. [3]

1. Graduated MSc, Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Saba Institute of Higher Education, Urmia
2. Ph.D. student of Food Biotechnology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz
3. Retired Assistant Professor, Department of Biology, Urmia University, Urmia

(Received: 2018/02/09 Accepted:2018/11/26)

The aim of this study was to investigate the survival of *Lactobacillus casei* LAFTI-L26 in Dutch red cheese. For this purpose, the effect of thermal treatments (pasteurization and non-pasteurization), different concentrations of brine (0%, 2.5%, and 5%), brining time (1, 2 and 3 days) and the ripening time (1, 30 and 60 days) on *L. casei* survival and physicochemical properties of cheese including pH, dry matter, fat percentage, salt percentage, and acidity were studied. The results showed that there was a significant increase in the pH of cheeses (pasteurized and non-pasteurized, etc.) after 60 days of dying ($p < 0.05$). Fat content of non-pasteurization cheeses increased significantly during ripening ($p<0.05$). Total microbial load increased significantly during storage ($p<0.05$). The acidity of the cheeses decreased significantly during storage ($p<0.05$), also it was significantly increased with increasing the brining time of non-pasteurized cheeses ($p<0.05$). The heat treatment (pasteurization) caused a significant reduction in the salt content of the samples ($p <0.05$). By increasing the ripening time, *L. casei* bacteria increased significantly in all samples ($p <0.05$), and pasteurization increased the viability of the *L. casei* bacteria. Increasing the percentage of salts in pasteurized cheese significantly increased the viability of the *L. casei* ($p <0.05$). In general, based on the results, Dutch red cheese produced in Salmas city was an appropriate carrier for *L. casei* (LAFTI-L26 DSL).

Key words: *Lactobacillus casei* LAFTI-L26, Dutch red cheese, Survival

* Corresponding Author E-Mail Address: s.amiri@tabrizu.ac.ir