

تأثیر پوشش خوراکی بر پایه کنسانتره پروتئین آب پنیر حاوی ناتامایسین یا کونژوگه آنزیم لیزوزیم-گزانتان بر خصوصیات میکروبی پنیر سفید فراپالایشی

عباس جلیل زاده¹، جواد حصاری^{2*}، سیدهادی پیغمبر دوست³، حسین جدیری⁴،
عیسی جاویدی پور⁵

1- دانش آموخته دکتری، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

2- استاد، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

3- استاد، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

4- کارشناس ارشد، مدیر تحقیق و توسعه پگاه تبریز، تبریز، ایران

5- گروه مهندسی صنایع غذایی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه یوزونجییل وان، وان، ترکیه

(تاریخ دریافت: 96/10/12 تاریخ پذیرش: 97/03/24)

چکیده

در این تحقیق تأثیر پوشش‌های خوراکی بر پایه پروتئین آب پنیر حاوی غلظت‌های مختلف ناتامایسین و کونژوگه لیزوزیم- صمغ گزانتان بر خصوصیات میکروبی پنیر سفید فراپالایش مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور *اشریشیاکلی* O157:H7 (به عنوان یک شاخص برای باکتری‌های گرم منفی و مقاوم در برابر پاستوریزاسیون تجاری)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (به عنوان شاخص باکتری‌های گرم مثبت) و کپک *پنی سیلیوم کریزوژنوم* بر روی سطح پنیر سفید فراپالایشی (UF) تلقیح شد و خواص میکروبی پنیر در طول 28 روز دوره نگهداری ارزیابی شد. نتایج نشان داد که همه تیمارهای پوشش خوراکی به طور معنی داری رشد کپک *پنی سیلیوم کریزوژنوم* را کاهش داد. پوشش‌های حاوی ناتامایسین در کاهش جمعیت این کپک مؤثرتر از پوشش‌های حاوی لیزوزیم-گزانتان بودند. پوشش حاوی با غلظت 600 پی‌پی‌ام باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7 به میزان 2/09 سیکل لگاریتمی در مقایسه با نمونه‌های بدون پوشش کاهش داد. همچنین رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در تمامی نمونه‌های تیمار شده با آنزیم لیزوزیم-گزانتان، کمتر از نمونه کنترل بود. کمترین میزان رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه پوشش داده شده حاوی 600 پی‌پی‌ام لیزوزیم-گزانتان در روز 28 مشاهده شد که جمعیت میکروبی آن 2/60 لگاریتم بود. برخلاف سایر تیمارها، روند رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه پوشش داده شده با پروتئین آب پنیر حاوی 600 پی‌پی‌ام آنزیم لیزوزیم-گزانتان تا روز 28 ام، نزولی بود به طوری که جمعیت آن از 5/41 لگاریتم در روز نخست، به 2/60 لگاریتم در روز 28 ام کاهش یافت. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از پوشش‌های خوراکی بر پایه پروتئین آب پنیر به عنوان حامل ناتامایسین و کونژوگه لیزوزیم گزانتان در غلظت بهینه می‌تواند جهت افزایش کیفیت میکروبی پنیر فراپالایشی مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژگان: پوشش خوراکی، *اشریشیاکلی* O157:H7، کونژوگه لیزوزیم- گزانتان، *استافیلوکوکوس اورئوس*، پنیر سفید فراپالایشی

1- مقدمه

پنیر یکی از مواد غذایی است که مصرف آن سهم قابل توجهی در رژیم غذایی متعادل و سالم دارد. داشتن شاخص گلیسمی پایین، محتوای پروتئین بالا، در برداشتن ویتامین‌های A، D، B6، B9، مواد معدنی و انواع طعم‌دهنده پنیر را به عنوان یک جزء بسیار جذاب از وعده‌های غذایی مطرح کرده است [1]. پنیر فرآپالایش شده یا UF¹ مهم‌ترین پنیر صنعتی کشور ما است. پنیر فرآپالایش حاوی حداقل 34 درصد وزنی ماده خشک، 12 درصد پروتئین، اسیدیته حداکثر 1/8% بر مبنای اسیدلاکتیک و pH 4/6 تا 5/2 بوده و حداکثر 5 درصد نمک دارد [2]. این نوع پنیر بدون حفره و دارای بافتی یکپارچه است. این محصول به علت دارا بودن pH پایین در سطح توسط میکروارگانیسم‌های نامطلوب به‌ویژه کپک و مخمر آلوده می‌شود. رشد کپک و مخمر در پنیر فتای UF از دلایل اصلی پایین بودن ماندگاری این فرآورده است. یکی دیگر از مشکلاتی که در صنایع لبنی وجود دارد عدم کفایت پاستوریزاسیون حرارتی برای غیرفعال کردن برخی از میکروارگانیسم‌ها است. اگرچه گزارش شده *E.coli* توسط پاستوریزاسیون نابود می‌شود، گزارش‌هایی مبنی بر توانایی آن (از جمله گونه بیماری‌زای آن O157:H7) بر تشکیل بیوفلم در تجهیزات پاستوریزاسیون وجود دارد که نشانگر نارسایی پاستوریزاسیون است [3]. استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی O157:H7 از جمله پاتوژن‌هایی هستند که توجه زیادی را در صنایع لبنی به خود جلب نموده‌اند. استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند در پنیرهای سفید آب‌نمکی به‌خصوص در حضور مخمرها حتی در pH پایین و میزان بالای نمک زنده بماند. اشریشیاکلی کلی O157:H7 به‌عنوان خطر بالقوه برای پنیر نرم و نیمه سخت هست. نشان داده شد که باکتری O157:H7 به‌طور کامل در پنیر غوطه‌ور شده در آب‌نمک داغ ظرف مدت 30 روز از رسیدن مهار شد. بااین‌حال، همان پاتوژن حتی در غلظت نمک بالای (به‌عنوان مثال، 17,5٪ نمک) در پنیر غیر غوطه‌ور فعال باقی‌مانده است [4]. برای غلبه برای مشکل راهکارهای مختلفی پیشنهاد شده و تحقیقاتی در این زمینه صورت گرفته است. پوشش‌های خوراکی بر پایه پروتئین‌آب‌پنیر حاوی مواد ضد میکروبیکی از این راهکارها است.

لیزوزیم که در سال 1922 توسط الکساندر فلمینگ کشف شد، دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت را هیدرولیز می‌کند؛ بنابراین، لیزوزیم می‌تواند به‌عنوان ماده نگه‌دارنده در تولید پنیر برای جلوگیری از عییب تولید گاز ناشی از کستریدیوم تیروبرتریوم استفاده شود [5]. لیزوزیم هیدرولاز N-acetylmuramoyl پپتیدوگلیکان است که در درجه اول بر باکتری‌های گرم مثبت مؤثر است. لیزوزیم پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتریایی را هیدرولیز کرده و به این ترتیب سلول را تجزیه می‌کند [6]. گزارش شده است که کونژوگه کردن آنزیم لیزوزیم با برخی از پلی‌ساکاریدها می‌تواند طیف فعالیت ضد میکروبی و خواص عملکردی، از قبیل حلالیت، پایداری امولسیون، پایداری فوم، پایداری حرارتی، ظرفیت اتصال آب و فعالیت آنتی‌اکسیدانی لیزوزیم بهبود دهد [7، 8]. امیری و همکاران (2008) گزارش کردند که کونژوگه کردن لیزوزیم - دکستران اثر ضد میکروبی خوبی بر اشریشیاکلی در مقایسه با آنزیم اصلاح‌نشده دارد، درحالی‌که بر استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با آنزیم لیزوزیم غیر کونژوگه تفاوت معنی‌داری ندارد [9]. تاکاشی و همکاران (2000) اقدام به کونژوگه کردن لیزوزیم و گلوکز استتاریک مونواستر کردند و طی آن بهبود فعالیت ضدباکتریایی، افزایش پایداری حرارتی و بهبود فعالیت امولسیون‌کنندگی مشاهده شد [10].

ناتامایسینیک ضد قارچ طبیعی و متعلق به آنتی‌بیوتیک پلی‌اتیلنی است که در طی تخمیر هوازی غوطه‌وری توسط استرپتومایسس ناتالانسیس و سویه‌های مرتبط تولید می‌شود. اولین بار در سال 1955 از محیط کشت فیلتر شده استرپتومایسس ناتالانسیس ایزوله شده از خاک کشف شد. حلالیت کم آن در آب و بیشتر حلال‌های آلی آن را برای تیمار سطح غذا مناسب می‌کند. غلظت مورد استفاده از ناتامایسین بین 1 تا 20 ppm است [11]. ناتامایسین تقریباً علیه تمام مخمرها و کپک‌ها فعال است، اما تأثیری بر روی باکتری، پروتوزوا یا ویروس ندارد. کاربرد مستقیم ناتامایسین در سطح غذا توسط اسپری کردن یا غوطه‌وری نتایج مشکوکی به‌خاطر چسبندگی نامناسب، انتشار سریع مولکول‌های ماده غذایی و در نتیجه کاهش غلظت در سطح را نشان می‌دهد به بیان دیگر روش‌های مذکور ماده فعال ضدقارچی را به‌طور نسبی غیرفعال نموده و باعث مهاجرت سریع به غذا می‌شود درحالی‌که

2-2- مراحل آماده‌سازی و تولید نمونه‌های پنیر

در این تحقیق آماده‌سازی و تولید نمونه‌های پنیر مطابق شکل 1 و به روش حصاری و همکاران (2006) در کارخانه پگاه آذربایجان شرقی (تبریز) انجام گرفت [12]. بعد از تولید نمونه‌های پنیر ابتدا سوسپانسیون میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه تهیه شد و با پیپت استریل روی سطح پنیر تلقیح شد. سپس نمونه‌های پنیر به روش غوطه‌وری پوشش داده شد [13].

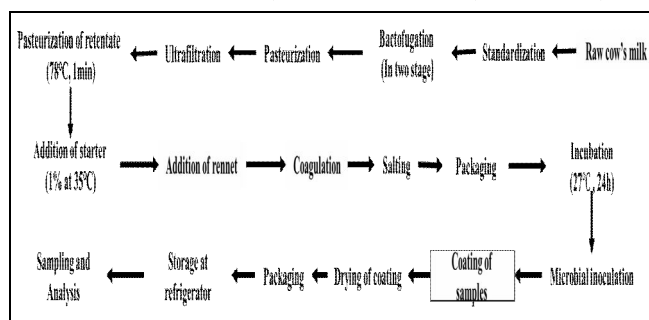


Fig 1 Preparation and production of cheese samples with edible coating treatment

2-3- روش تهیه محلول پوشش خوراکی

برای تهیه پوشش خوراکی از روش پرزگاگو و کروچتا (2002) [14] و راموس و همکاران (2012) [15] با اندکی اصلاح استفاده شد. به این ترتیب که 8 گرم پودر پروتئین آب پنیر در 92ml آب مقطر 2 بار تقطیر در یک بشر حل شد و در حمام آبی تا دمای 90°C حرارت داده شد، بعد به مدت 45 الی 60 دقیقه در این دما نگه داشته شد. در مدت حرارت دهی به مقدار 5 گرم گلیسرول، 5 گرم موم و توئین 80 به مقدار 0/15 گرم اضافه گردید. بعد از حرارت دهی لازم از بن ماری خارج و در آب یخ قرار داده شد. سپس به مدت 3 الی 4 دقیقه توسط اولتراتوراکس با سرعت 15000rpm هموژنیزه شد. قابل توجه است که در حین حرارت pH پوشش در 8 تنظیم شد. به فرمولاسیون پوشش کونژوگه لیزوزیم-گزانتاندر غلظت‌های مختلف (200، 400 و 600ppm) اضافه شد. ناتامایسین نیز در غلظت‌های 10، 20 و 30 پی‌پی‌ام به فرمولاسیون پوشش افزوده شد و یک نمونه بدون پوشش به‌عنوان نمونه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت.

2-4- روش کونژوگه کردن آنزیم لیزوزیم -

صمغ گزانتان

برای کونژوگه کردن آنزیم لیزوزیم - گزانتان از روش هاشمی و همکاران (2014) استفاده شد [16]. به این ترتیب که آنزیم

استفاده از فیلم و پوشش بر پایه پلیمرهای ضد میکروبی کارایی بیشتری فراهم می‌کند که ناشی از باقی ماندن غلظت بالاتری از ماده فعال در سطح است. علاوه بر این به دلیل حلالیت ناچیز ناتامایسین در آب گنجانیدن آن در پوشش به نفع توزیع خوب در پنیر است.

بر اساس مطالعات انجام‌شده تاکنون استفاده از پوشش‌های خوراکی بر مبنای پروتئین آب پنیر حاوی کونژوگه آنزیم لیزوزیم-گزانتان و ناتامایسین بر ماندگاری پنیر سفید فراپالایشی مورد ارزیابی قرار نگرفته است. لذا هدف این پژوهش بررسی تأثیر این پوشش خوراکی بر خصوصیات میکروبی پنیر فراپالایشی در طی 28 روز نگهداری بوده است.

2- مواد و روش‌ها

1-2- مواد

شیر خام (تهیه‌شده از کارخانه پگاه تبریز)، آغازگر مرکب از کشت‌های مزوفیل (لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه کرموریس و لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس) و ترموفیل (استرپتوکوکوس سالیموریوس زیرگونه ترموفیلوس) بانام تجاری CHOOZITTMRA22 LYO (شرکت دنیسکو، دانمارک)، مایه پنیر قارچی فروماز مشتق از ریزوموکور میهی (شرکت سیلین، فرانسه)¹، سوش‌های میکروبی اشریشیاکلی O157:H7، استافیلوکوکوس اورئوس ATCC6538 و کپک پنی‌سیلیوم کریزوژنوم ATCC 117 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه شده تهیه شد. کلیه مواد شیمیایی، محیط‌های کشت و حلال‌های مورد استفاده در این پروژه تحقیقاتی، ساخت شرکت تجاری مرک آلمان و سیگما با درجه خلوص تجزیه‌ای بودند. کنسانتره پروتئین آب‌پنیر با مشخصات جدول 1 از شرکت Agri Marck تهیه شد.

Table 1 Specifications of Whey Protein Concentrate

Specifications	Amount
Protein (dry basis)	81%
Fat	5.5%
Ash	3%
Moisture	5.3%
Carbohydrate	10%
pH (10% solution)	6.1

1. DSM FoodSpecialities, Seclin, France

کیک پنی سیلیوم کریزوزنوم در جدول 2 آورده شده است. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که همه تیمارهای پوشش خوراکی به طور معنی داری ($P < 0.05$) رشد کیک پنی سیلیوم کریزوزنوم را کاهش داد. پوشش های حاوی ناتامایسین در کاهش این کیک موفق تر از پوشش های حاوی لیزوزیم-گزانتان عمل کردند به طوری که پوشش های حاوی 30 پی پی-ام ناتامایسین توانست رشد این کیک را از مقدار اولیه $0/12 \pm 5/08$ لگاریتم به $0/09 \pm 1/99$ لگاریتم در روز پانزدهم کاهش دهد. از روز پانزدهم تا روز 28 مقدار این کیک اندکی افزایش یافت و به $0/16 \pm 2/29$ رسید. این در حالی است که جمعیت این کیک در نمونه کنترل به $0/20 \pm 7/69$ رسید. در پژوهشی که توسط پینادو و همکاران (2010) انجام گرفت، اثر فیلم های خوراکی ایزوله پروتئین آب پنیر حاوی ناتامایسین، نیسین و اسید مالیک بر روی کنترل میکروب های پاتوژن در سطح پنیر مورد مطالعه قرار گرفت [18]. داده های این پژوهش نشان داد که فیلم های حاوی ناتامایسین توانست رشد کیک پنی سیلیوم کریزوزنوم را به خوبی مهار کند. یلدریم و همکاران (2006)، تأثیر پوشش کازئین به عنوان حامل ناتامایسین را برای ارزیابی خواص پنیر کاشار مورد ارزیابی قراردادند. این محققین نشان دادند که پوشش پنیر با کازئین حاوی ناتامایسین می تواند تا مدت یک ماه، رشد کیک و مخمر را متوقف کند [19]. در مطالعه دیگری دوس سانتوز پیرس و همکاران (2008) از فیلم پلیمر سلولز حاوی ناتامایسین، نیسین و ترکیب آنها برای ارزیابی خواص پنیر موزارلا استفاده کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که پوشش حاوی 8 درصد ناتامایسین با خلوص 50 درصد، رشد کیک و مخمر را به میزان 2 لگاریتم کاهش داد [20]. فاجاردو و همکاران (2010)، از فیلم کیتوزان به عنوان حامل ناتامایسین برای بهبود ماندگاری پنیر سالونیو¹ استفاده کردند. داده های این تحقیق نشان داد که استفاده از ناتامایسین می تواند رشد کیک و مخمر را 1/1 لگاریتم، در طی 27 روز نگهداری کاهش دهد [21]. نتایج پژوهش حاضر همچنین با نتایج کالینتری و همکاران (2013) مطابقت خوبی دارد. بر اساس نتایج این محققین، افزودن 0/02 درصد ناتامایسین به پنیر گالوتیری² توانست به طور معناداری ($P < 0/05$) رشد کیک و مخمر را کنترل نماید، به طوری که طی 30 روز نگهداری پنیر، میزان کیک و مخمر در نمونه کنترل از $4\log$ به $7/2\log$

لیزوزیم-گزانتان به نسبت 1:1 (40 میلی گرم از هر کدام) با همدیگر مخلوط شد و در 2 ml محلول بافر فسفات 0/1 مول بر لیتر در دمای اتاق حل شد و در دمای 60 درجه سانتی گراد به مدت 10 روز گرمخانه گذاری شد. سپس در غلظت های متفاوت به فرمولاسیون پوشش اضافه شد.

5-2- آزمون های میکروبی

ابتدا میکروارگانیسم های تهیه شده از حالت لیوفیلیزه مطابق روش توصیه شده سازمان پژوهش های علمی و صنعتی خارج شد و جهت تهیه پیش کشت باکتری ها از محیط کشت TSB استفاده شد. شمارش میکروبی / استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از محیط کشت اختصاصی ببرد پارکر آگار (مرک آلمان) و به روش کشت سطحی و انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 48 ساعت در مدت زمان های 0، 3، 7، 14، 21 و 28 روز پس از تولید انجام شد. شمارش باکتری *E. coli* O157:H7 با استفاده از محیط کشت مک کانکی آگار با سوربیتول بعد از 24 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی گراد انجام شد [17]. برای شمارش کیک پنی سیلیوم کریزوزنوم از محیط کشت PDA استفاده شد. به این ترتیب که پلیت ها در دمای 25 درجه سانتی گراد به مدت 3 الی 5 روز گرمخانه گذاری شده و سپس شمارش کیک مخمر انجام شد [2].

2-6- تجزیه و تحلیل آماری

داده های حاصل از آزمایش ها بر پایه بلوک های کاملاً تصادفی جهت ارزیابی تیمارهای مختلف و زمان رسیدن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. از نرم افزار SPSS (نسخه 21) جهت آنالیز داده ها استفاده شد. تفاوت های معنی دار در نتایج با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه تخمین زده شد. به منظور مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح معنی داری ($P < 0/05$) استفاده شد. تمامی آزمایش ها در 3 تکرار انجام گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل 2013 انجام شد.

3- نتایج و بحث

3-1- تأثیر پوشش خوراکی بر رشد کیک

پنی سیلیوم کریزوزنوم

نتایج تأثیر پوشش های خوراکی بر رشد

1. Saloio cheese
2. Galotyri cheese

بود ولی در هفته سوم و چهارم این روند شتاب بیشتری داشت. دووان و همکاران (2007)، تأثیر پوشش و فیلم کیتوزان حاوی آنزیم لیزوزیم را بر ماندگاری پنیر موزارلا مورد ارزیابی قرار دادند [24]. نتایج این پژوهش نشان داد که روند رشد کپک و مخمر در نمونه‌های پوشش داده شده کمتر از نمونه‌های بدون پوشش بود که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. کاهش رشد کپک در نمونه‌های پوشش داده شده، می‌تواند به کاهش نفوذ اکسیژن نسبت داده شود. در پژوهش دیگری پوشش آلزینات-لیزوزیم بر روی پنیر کواله‌و مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نیز نشان داد که آلودگی قارچی نمونه‌های پوشش داده شده کمتر از نمونه‌های بدون پوشش بود. باینکه لیزوزیم و آلزینات فعالیت ضدقارچی ندارند، این محققین دلیل آلودگی کمتر نمونه‌های پوشش داده شده را کاهش نفوذ اکسیژن بیان کردند که با یافته‌های ما مطابقت دارد [25].

افزایش یافت ولی در نمونه‌های تیمار شده با ناتامایسین میزان کپک و مخمر در پایان دوره نگهداری در حدود $3 \log$ بود [22]. نتایج پژوهش حاضر همچنین با نتایج کیسی و براندلی (2012) همخوانی دارد [23]. در نمونه‌های پوشش‌دار شده با پروتئین آب‌پنیر حاوی لیزوزیم-گزانتان در تمامی تیمارها کپک پنی‌سیلیوم کریزوژنوم روند رشد صعودی طی نمود؛ اما روند رشد در نمونه‌های پوشش‌دار، آهسته‌تر از نمونه کنترل بود. به‌طوری‌که در طی 28 روز نگهداری جمعیت میکروبی در نمونه کنترل از مقدار اولیه تلقیح شده $0/05 \pm 5/01$ لگاریتم به $0/20 \pm 7/69$ افزایش یافت؛ درحالی‌که در نمونه‌های پوشش‌دار حداکثر میزان رشد $0/11 \pm 6/87$ لگاریتم بود و بین غلظت‌های مختلف لیزوزیم-گزانتان تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/05$). در طی دو هفته اول نگهداری، روند رشد کپک پنی‌سیلیوم کریزوژنوم در نمونه‌های پوشش داده شده آهسته‌تر

Table 2 The Effect of WPC- based edible containing Natamycin and Lysozyme-Xanthanate Conjugate on *Phenicillium Chrysogenum* growth in UF cheese during 28 days

Days						Treatment
28	21	15	7	3	1	
7.69 ± 0.20^{Ed}	7.56 ± 0.04^{De}	7.77 ± 0.04^{Ed}	7.16 ± 0.02^{Ce}	6.61 ± 0.07^{Be}	5.01 ± 0.05^{Aa}	Control
4.53 ± 0.13^{Bb}	4.49 ± 0.11^{Bc}	3.62 ± 0.15^{Ab}	3.82 ± 0.11^{Ac}	4.53 ± 0.13^{Bc}	5.04 ± 0.11^{Ca}	Coating + 10 ppm natamycin
4.14 ± 0.20^{Cb}	3.68 ± 0.21^{Bb}	3.82 ± 0.11^{Bb}	3.24 ± 0.06^{Ab}	3.92 ± 0.08^{Bb}	5.05 ± 0.09^{Da}	Coating + 20 ppm natamycin
2.29 ± 0.16^{Ba}	2.19 ± 0.20^{ABa}	1.99 ± 0.09^{Aa}	2.34 ± 0.12^{Ba}	3.28 ± 0.17^{Ca}	5.08 ± 0.12^{Da}	Coating + 30 ppm natamycin
6.73 ± 0.03^{Fc}	6.58 ± 0.01^{Ed}	5.60 ± 0.04^{Dc}	5.31 ± 0.01^{Cd}	5.15 ± 0.01^{Bd}	5.00 ± 0.03^{Aa}	Coating + 200 ppm Lyz-Xan
6.76 ± 0.04^{Fc}	6.60 ± 0.02^{Ed}	5.65 ± 0.07^{Dc}	5.39 ± 0.07^{Cd}	5.13 ± 0.01^{Bd}	4.99 ± 0.03^{Aa}	Coating + 400 ppm Lyz-Xan
6.87 ± 0.11^{Fc}	6.64 ± 0.14^{Ed}	5.62 ± 0.09^{Dc}	5.31 ± 0.07^{Cd}	5.12 ± 0.04^{Bd}	5.00 ± 0.02^{Aa}	Coating + 600 ppm Lyz-Xan

*Values are mean of at least 3 replicates $\pm$ standard deviation between means.

*A-D Different uppercase superscripts differ between ripening times within the same sample ($P > 0.05$).

*a-d Different lowercase superscripts differ between treatments within the same ripening time ($P > 0.05$).

یافت. مقدار این باکتری در پوشش‌های حاوی 200 و 400 ppm لیزوزیم-گزانتان تا روز 15 کاهش یافت و از روز پانزدهم به بعد مجدداً افزایش یافت و در روز 28 به ترتیب به $2/80 \pm 0/09$ و $4/25 \pm 0/14$ لگاریتم رسید. در نمونه‌های پوشش داده شده حاوی ناتامایسین هم روند رشد باکتری کندتر از نمونه کنترل بود. گرچه گزارش شده است که ناتامایسین بر روند رشد باکتری‌ها مؤثر نیست، لیکن کاهش رشد باکتری در تیمارهای حاوی ناتامایسین نسبت به نمونه بدون پوشش می‌تواند به دلیل کاهش اکسیژن در دسترس باشد.

3-2- تأثیر پوشش خوراکی بر رشد

اشریشیاکلی O157:H7

نتایج تأثیر پوشش‌های خوراکی بر رشد اشریشیاکلی O157:H7 در نمودار 2 آورده شده است. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تأثیر تمامی پوشش‌های خوراکی بر رشد باکتری اشریشیاکلی O157:H7 معنی‌دار بود ($P < 0/05$) بیشترین میزان کاهش، مربوط به نمونه پوشش حاوی لیزوزیم-گزانتان با غلظت 600ppm بود که مقدار این باکتری از مقدار اولیه تلقیح شده $4/22 \pm 0/17$ لگاریتم به $2/11 \pm 0/06$ لگاریتم کاهش

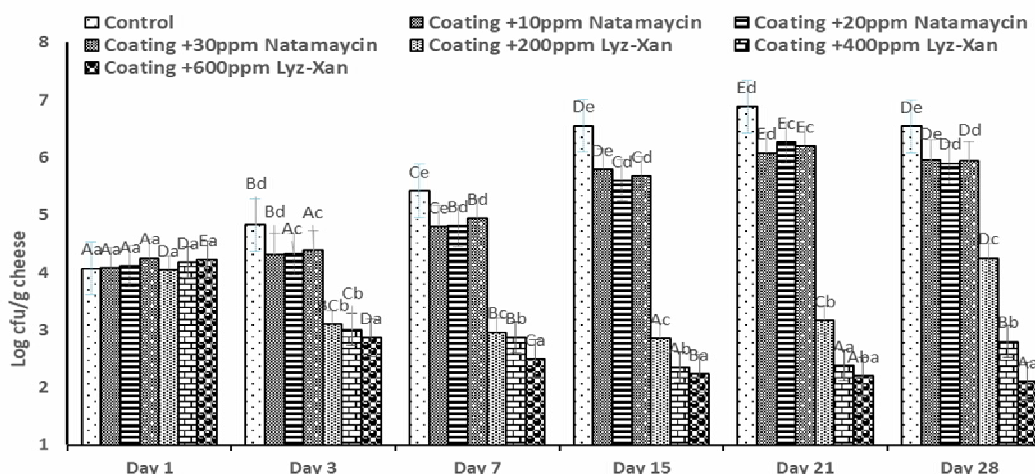


Fig 2 The Effect of WPC- based edible containing Natamycin and Lysozyme-Xanthanate Conjugate on *Escherichia coli* O157: H7 growth in UF cheese during 28 days

A–D Different uppercase superscripts differ between ripening times within the same sample ($P > 0.05$).

a–d Different lowercase superscripts differ between treatments within the same ripening time ($P < 0.05$).

به $7/37 \pm 0/07$ لگاریتم از روز 28 افزایش یافت. در نمونه‌های پوشش داده شده حاوی درصد‌های مختلف ناتامایسین نیز، روند رشد این باکتری صعودی بود، اما نسبت به نمونه کنترل روند رشد آهسته‌تری داشت. جمعیت این باکتری در نمونه‌های پوشش داده‌شده حاوی 10، 20 و 30 ppm ناتامایسین به ترتیب از $5/29 \pm 0/21$ ، $5/33 \pm 0/16$ و $5/24 \pm 0/18$ در روز اول، به $6/52 \pm 0/12$ ، $6/45 \pm 0/02$ و $6/49 \pm 0/14$ لگاریتم در پایان هفته چهارم رسید. نتایج همچنین نشان داد بین غلظت‌های مختلف ناتامایسین تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$). کمترین میزان رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه پوشش داده‌شده حاوی 600 ppm لیزوزیم-گزانتان در روز 28 مشاهده شد که $2/60 \pm 0/12$ لگاریتم بود. نتایج آنالیز واریانس همچنین نشان داد که جمعیت این باکتری در نمونه‌های پوشش داده شده حاوی غلظت‌های 200 و 400 ppm نیز نسبت به نمونه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. در این تیمارها جمعیت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تا روز 15 روند کاهشی داشت ولی از روز 15 به بعد جمعیت این باکتری مجدداً افزایش داشت ولی در پایان هفته چهارم نگهداری جمعیت باکتری کمتر از نمونه بدون پوشش بود. برخلاف سایر تیمارها، روند رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه پوشش داده شده با پروتئین آب‌پنیر حاوی 600 ppm آنزیم لیزوزیم-گزانتان تا روز 28 ام، نزولی بود به‌طوری‌که جمعیت آن از $5/41 \pm 0/15$ لگاریتم در

با وجود این‌که گزارش شده است لیزوزیم به تنهایی فقط بر برخی باکتری‌های گرم مثبت تأثیرگذار است، ولی نتایج پژوهش هاشمی و همکاران (2014)، نشان داد که کونژوگه کردن آنزیم لیزوزیم با گزانتان می‌تواند بر باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* نیز تأثیرگذار باشد که با یافته‌های ما مطابقت دارد [16]. گرچه ناتامایسین به‌عنوان یک ماده ضد قارچی مطرح هست، ولی پوشش‌های حاوی ناتامایسین روند رشد باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7 را نسبت به نمونه بدون پوشش کند نمود. دلیل این امر را می‌توان به تأثیر پوشش بر میزان اکسیژن در دسترس برای رشد این میکروارگانیسم نسبت داد. این داده با نتایج راموس و همکاران (2012)، فاجاردو و همکاران (2010) و رسا و همکاران (2014) همخوانی دارد [15، 21، 26].

3-3- تأثیر پوشش خوراکی بر رشد

استافیلوکوکوس اورئوس

میکروارگانیسم دیگری که به‌عنوان شاخص باکتری‌های گرم مثبت و یک باکتری پاتوژن مورد ارزیابی قرار گرفت، *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. نتایج تأثیر پوشش‌های خوراکی بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمودار 3 آورده شده است. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که رشد این باکتری در تمامی نمونه‌های تیمار شده، کمتر از نمونه کنترل بود. جمعیت این باکتری در نمونه کنترل، از $5/32 \pm 0/12$ لگاریتم در روز نخست

غلظت میکروگرم بر لیتر، سبب کاهش رشد / استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب به میزان تقریباً 1/7 و 2 لگاریتم نسبت به نمونه کنترل شد.

روز نخست، به $2/60 \pm 0/12$ لگاریتم در روز 28 ام کاهش یافت. این نتایج تا حدودی با نتایج هاشمی و همکاران (2014) مطابقت دارد [16]. این محققین گزارش کردند که آنزیم لیزوزیم به تنهایی و در حالت کونژوگه شده با گزانتان در

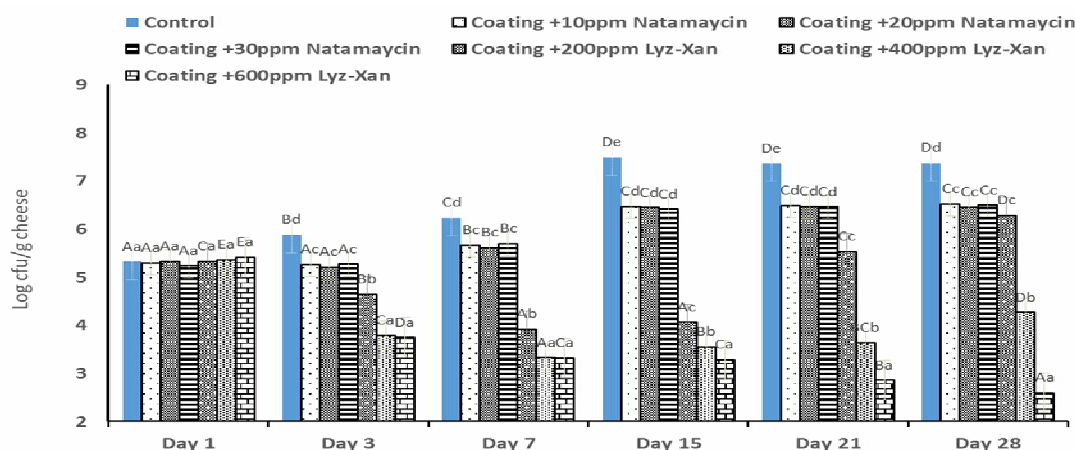


Fig 3 The Effect of WPC- based edible containing Natamycin and Lysozyme-Xanthanate Conjugate on *Staphylococcus aureus* growth in UF cheese during 28 days

A–D Different uppercase superscripts differ between ripening times within the same sample ($P > 0.05$).

a–d Different lowercase superscripts differ between treatments within the same ripening time ($P < 0.05$).

یا ناتامایسین را بر روی پنیر هالومی¹ مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که افزودن آنزیم لیزوزیم، اثر مهارکنندگی کیتوزان بر باکتری‌های اسیدلاکتیک را تقویت نمود ولی در نمونه‌های پوشش‌دار حاوی ناتامایسین، جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک در پایان هفته چهارم بیشتر از نمونه بدون پوشش بود که با یافته‌های ما همخوانی دارد [28]. در پژوهش دیگری که توسط کونته و همکاران (2009) صورت گرفت تأثیر پوشش خوراکی بر پایه آلزینات سدیم حاوی آنزیم لیزوزیم و اتیلن‌دی‌آمین‌تتراستیک اسید در شرایط اتمسفر معمولی و اتمسفر بهبود یافته بر ماندگاری پنیر فیوردی لاتِه² مورد ارزیابی قرار گرفت. این محققین گزارش کردند که نوع بسته‌بندی بکار رفته تأثیر معنی‌داری بر جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک کوکسی شکل در طول 8 روز نگهداری نداشت ($P > 0/05$) که با نتایج پژوهش حاضر متناقض به نظر می‌رسد [29]. دلیل این تناقض را می‌توان در نوع استارتر مورد استفاده و مدت زمان مورد مطالعه جستجو کرد، از طرفی هانون و همکاران (2006) گزارش کردند که جمعیت استارتر در طول

3-3- تأثیر پوشش خوراکی بر فعالیت استارتر

پنیر

نتایج تأثیر پوشش‌های خوراکی مختلف بر روی جمعیت استارتر در جدول 3 آورده شده است. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تأثیر تیمار و زمان و اثر متقابل آن‌ها بر روی جمعیت استارتر معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$).

داده‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که پوشش حاوی ناتامایسین اثر بازدارندگی بر روی میکروفلور استارتر ندارد و در طول دوره رسیدن جمعیت آن‌ها علیرغم کاهش جزئی در طول زمان (به دلیل اتولیز)، در سطح قابل قبولی باقی می‌ماند. علاوه بر این در پوشش‌های حاوی ناتامایسین، جمعیت استارتر کمی بالاتر از نمونه‌های بدون پوشش بود. با این حال از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ($P < 0/05$) بین پوشش‌های حاوی غلظت‌های مختلف ناتامایسین مشاهده نشد. این نتایج با داده‌های راموس و همکاران (2012)، یانقلار و یلدیز (2016) و مهیار و همکاران (2018) به خوبی مطابقت دارد [15، 27، 28]. مهیار و همکاران (2018)، تأثیر پوشش کیتوزان حاوی لیزوزیم

1. Halloumi cheese

2. Fior di Latte cheese

نشان داد [31] ولی با نتایج کونته و همکاران (2011) در تناقض است [32].

رسیدن پنیر فرآپالایش به دلیل اتولیز کاهش می‌یابد که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد [30]. داده‌های این تحقیق همچنین با نتایج دلنویایل و همکاران (2009) مطابقت خوبی

Table 3 The Effect of WPC- based edible containing Natamycin and Lysozyme-Xanthanate Conjugate on cheese starter activity during 28 days

Days						Treatment
28	21	15	7	3	1	
7.66±0.26 ^{Ab}	8.19±0.31 ^{Bb}	8.27±0.29 ^{Bb}	8.36±0.27 ^{Bb}	8.93±0.08 ^{Cab}	8.16±0.12 ^{Ba}	Control
7.81±0.09 ^{Ab}	8.36±0.31 ^{Bb}	8.34±0.32 ^{Bb}	8.45±0.32 ^{Bb}	8.99±0.09 ^{Cab}	8.19±0.16 ^{Ba}	Coating + 10 ppm natamycin
7.87±0.15 ^{Ab}	8.3±0.29 ^{Bb}	8.30±0.32 ^{Bb}	8.40±0.24 ^{Bb}	8.89±0.13 ^{Cab}	8.16±0.14 ^{Ba}	Coating + 20 ppm natamycin
7.79±0.12 ^{Ab}	8.31±0.24 ^{Bcb}	8.35±0.28 ^{Bcb}	8.48±0.13 ^{Cb}	9.04±0.13 ^{Db}	8.09±0.20 ^{ABa}	Coating + 30 ppm natamycin
7.53±0.33 ^{Aab}	8.17±0.28 ^{Bb}	8.39±0.31 ^{Bb}	8.28±0.33 ^{Bab}	8.88±0.24 ^{Cab}	8.24±0.19 ^{Ba}	Coating + 200 ppm Lyz-Xan
7.23±0.36 ^{Aab}	7.89±0.30 ^{Bab}	8.01±0.29 ^{Bab}	8.02±0.15 ^{Bab}	8.97±0.25 ^{Cab}	8.11±0.28 ^{Ba}	Coating + 400 ppm Lyz-Xan
7.17±0.23 ^{Aa}	7.66±0.27 ^{Bab}	7.76±0.22 ^{Ba}	7.82±0.12 ^{Ba}	8.62±0.27 ^{Ca}	8.29±0.20 ^{Ca}	Coating + 600 ppm Lyz-Xan

*Values are mean of at least 3 replicates ± standard deviation between means.

* A-D Different uppercase superscripts differ between ripening times within the same sample (P>0.05).

* a-d Different lowercase superscripts differ between treatments within the same ripening time (P>0.05).

ultrasound treatment on microbial and physicochemical properties of Iranian ultrafiltered feta-type cheese. Journal of dairy science.

[3] Dewanti R., Wong A.C.L., 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7, Int. J. Food Microbiol. 26, 147-164.

[4] Robinson, R.K., 2014. Encyclopedia of food microbiology. Academic press.

[5] Wasserfall, F., & Teuber, M., 1979. Action of egg white lysozyme on *Clostridium tyrobutyricum*. Applied and Environmental Microbiology, 38(2), 197-199.

[6] Masschalck, B., and C. W. Michiels. 2003. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. Crit. Rev Microbiol. 29:191-214.

[7] Aminlari, M., Ramezani, R. and Jadidi, F., 2005. Effect of Maillard - based conjugation with dextran on the functional properties of lysozyme and casein. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85(15), pp.2617-2624.

[8] Dickinson, E., 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. Food hydrocolloids, 17(1), pp.25-39.

[9] Amiri, S., Ramezani, R. and Aminlari, M., 2008. Antibacterial activity of dextran-conjugated lysozyme against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in cheese curd. Journal of food protection, 71(2), pp.411-415.

4- نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که پوشش خوراکی حاوی ناتامایسین توانست رشد کپک پنی‌سیلیوم کریزوژنوم را به مقدار 3/09 سیکل لگاریتمی کاهش دهد ولی بر روند رشد استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیاکلی O157:H7 تأثیر محسوسی نداشت. پوشش خوراکی حاوی آنزیم لیزوزیم - گزانتان بر روند رشد کپک پنی‌سیلیوم کریزوژنوم تأثیر محسوسی نداشت ولی توانست رشد استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیاکلی O157:H7 را به صورت معنی‌داری ($P < 0/05$) کاهش دهد؛ بنابراین استفاده از این نوع پوشش خوراکی می‌تواند جهت بهبود خصوصیات میکروبی پنیر سفید فرآپالایش مورد استفاده قرار گیرد.

5- تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از شرکت پگاه تبریز و آزمایشگاه دپاکو به خاطر تأمین امکانات تولید و فضای آزمایشگاهی اعلام می‌دارند.

6- منابع

- [1] Mikkelsen, P., 2008. World Cheese Market 2000-2020.
- [2] Jalilzadeh, A., Hesari, J., Peighambardoust, S.H. and Javidipour, I., 2018. The effect of

- natamycin. *Italian Journal of Food Science*, 18(2).
- [20] dos Santos Pires, A.C., de Fátima Ferreira Soares, N., de Andrade, N.J., da Silva, L.H.M., Camilloto, G.P. and Bernardes, P.C., 2008. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. *Packaging Technology and Science*, 21(7), pp.375-383.
- [21] Fajardo, P., Martins, J.T., Fuciños, C., Pastrana, L., Teixeira, J.A. and Vicente, A.A., 2010. Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, 101(4), pp.349-356.
- [22] Conte, A., Gammariello, D., Di Giulio, S., Attanasio, M. and Del Nobile, M.A., 2009. Active coating and modified-atmosphere packaging to extend the shelf life of Fior di Latte cheese. *Journal of Dairy Science*, 92(3), pp.887-894.
- [22] Kallinteri, L.D., Kostoula, O.K. and Savvaidis, I.N., 2013. Efficacy of nisin and/or natamycin to improve the shelf-life of Galotyri cheese. *Food microbiology*, 36(2), pp.176-181.
- [23] Cé, N., Noreña, C.P. and Brandelli, A., 2012. Antimicrobial activity of chitosan films containing nisin, peptide P34, and natamycin. *CyTA-Journal of Food*, 10(1), pp.21-26.
- [24] Duan, J., Kim, K., Daeschel, M.A. and Zhao, Y., 2008. Storability of Antimicrobial Chitosan - Lysozyme Composite Coating and Film - Forming Solutions. *Journal of food science*, 73(6), pp.M321-M329
- [25] Medeiros, B.G.D.S., Souza, M.P., Pinheiro, A.C., Bourbon, A.I., Cerqueira, M.A., Vicente, A.A. and Carneiro-da-Cunha, M.G., 2014. Physical characterisation of an alginate/lysozyme nano-laminate coating and its evaluation on 'Coalho'cheese shelf life. *Food and bioprocess technology*, 7(4), pp.1088-1098.
- [26] Resa, C.P.O., Gerschenson, L.N. and Jagus, R.J., 2014. Natamycin and nisin supported on starch edible films for controlling mixed culture growth on model systems and Port Salut cheese. *Food Control*, 44, pp.146-151.
- [27] Yangilar, F. and Oğuzhan Yıldız, P., 2016. Casein/natamycin edible films efficiency for controlling mould growth and on microbiological, chemical and sensory properties during the ripening of Kashar
- [10] Takahashi, K., Lou, X. F., Ishii, Y. and Hattori, M. 2000. Lysozyme-glucose-stearicmonoester conjugate formed through maillard reaction as an antimicrobial emulsifier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2044-2049.
- [11] Delves-Broughton, J., Thomas, L.V., Doan, C.H. and Davidson, P.M., 2005. Natamycin. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 145, p.275.
- [12] Hesari, J., Ehsani, M.R., Khosroshahi, A. and McSweeney, P.L., 2006. Contribution of rennet and starter to proteolysis in Iranian UF white cheese. *Le Lait*, 86(4), pp.291-302.
- [13] Garemohammadloo E., Jalilzadeh A., and HESARI J., 2017. The effect of WPC-based edible catings containing nisin on whit-brined cheese shelf life. *JFST*, No.66, Vol. 14, 259-267.
- [14] Perez-Gago, M.B. and Krochta, J.M., 2002. Formation and properties of whey protein films and coatings. *Protein-based films and coatings*, pp.159-180.
- [15] Ramos Óscar L., Santos Arménia C., Leão Mariana V., Pereira Joana O., Silva Sara I., Fernandes João C., Franco M. Isabel, Pintado Manuela E., Malcata F. Xavier, 2012. Antimicrobial activity of edible coatings prepared from whey protein isolate and formulated with various antimicrobial agents. *International Dairy Journal* 25, 132-141.
- [16] Hashemi Mohammadi Marjan, Aminlari Mahmoud, Moosavinasab Marzieh, 2014. Preparation of and studies on the functional properties and bactericidal activity of the lysozyme -xanthan gum conjugate. *LWT - Food Science and Technology* 57, 594-602.
- [17] Otero, V., Becerril, R., Santos, J.A., Rodríguez-Calleja, J.M., Nerín, C. and García-López, M.L., 2014. Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157: H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). *Food Control*, 42, pp.296-302
- [18] Pintado Cristina M.B.S., Ferreira Maria A.S.S., Sousa Isabel, 2010. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin.
- [19] Yildirim, M., Güleç, F., Bayram, M. and Yildirim, Z., 2006. Properies of Kashar Cheese coated with casein as a carrier of

- [30] Hannon, J.A., Deutsch, S.M., Madec, M.N., Gassi, J.Y., Chapot-Chartier, M.P. and Lortal, S., 2006. Lysis of starters in UF cheeses: behaviour of mesophilic lactococci and thermophilic lactobacilli. *International dairy journal*, 16(4), pp.324-334.
- [31] Del Nobile, M.A., Gammariello, D., Conte, A. and Attanasio, M., 2009. A combination of chitosan, coating and modified atmosphere packaging for prolonging Fior di latte cheese shelf life. *Carbohydrate polymers*, 78(1), pp.151-156.
- [32] Conte, I. Brescia, and M. A. Del Nobile, 2011. Lysozyme/EDTA disodium salt and modified-atmosphere packaging to prolong the shelf life of burrata cheese. *J. Dairy Sci.* 94, 5289–5297.
- cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(7), pp.2328-2336.
- [28] Mehryar, G.F., Al Nabulsi, A.A., Saleh, M., Olaimat, A.N. and Holley, R.A., 2018. Effects of chitosan coating containing lysozyme or natamycin on shelf - life, microbial quality, and sensory properties of Halloumi cheese brined in normal and reduced salt solutions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1).
- [29] Conte, A., Gammariello, D., Di Giulio, S., Attanasio, M. and Del Nobile, M.A., 2009. Active coating and modified-atmosphere packaging to extend the shelf life of Fior di Latte cheese. *Journal of Dairy Science*, 92(3), pp.887-894.

The Effect of Whey Protein Concentrate Based Edible Coatings Containing Natamycin or Lysozyme-Xanthan conjugate on Microbial properties of ultrafiltrated white cheese

Jalilzadeh, A.¹, Hesari, J.^{2*}, Peighambaroust, S. H.³, Jodeiri, H.⁴, Javidipour, I.⁵

1. PhD candidate, Department of Food Science, College of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2. Professor, Department of Food Science, College of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz Iran.
3. Professor, Department of Food Science, College of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
4. Msc, Research and Development Manager, Tabriz Pegah co., Tabriz, Iran.
5. Professor, Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Van Yüzüncü Yıl University, Turkey.

(Received: 2018/01/02 Accepted: 2018/06/14)

In this research, the effects of whey protein concentrate based edible coatings containing different concentrations of natamycin and lysozyme-xanthan gum conjugate were investigated. For this purpose, *Escherichia coli* O157:H7 (as an indicator for gram negative bacteria and also resistant to commercial pasteurization), *Staphylococcus aureus* (as an indicator of gram-positive bacteria), and *Penicillium chrysogenum* were inoculated to ultrafiltrated white cheese surface and the microbial properties of cheese samples were evaluated during 28 days storing. The results showed that all coated treatments significantly reduced the growth of *Penicillium chrysogenum*. Natamycin-containing coatings have been more effective in reducing the mold population than lysozyme-xanthan-containing coatings. Coated samples containing 600 ppm lysozyme-xanthan reduced *E. coli* O157: H7 growth 2.09 log compared to control samples. Also, the growth rates of *Staphylococcus aureus* were lower in all samples treated with lysozyme-xanthan than control sample. The lowest growth rate of *Staphylococcus aureus* was observed in the coated sample containing 600 ppm lysozyme-xanthan on 28th day, with a microbial population of 2.60 logarithms. Unlike other treatments, the growth rate of *Staphylococcus aureus* in the sample coated containing 600 ppm lysozyme-xanthan was descending over 28 days. The results of this study showed that whey protein based edible coating can be used as a carrier of natamycin and lysozyme-xanthan in optimal concentration, for increasing the microbial quality of UF cheese.

Key words: Edible coating, *Escherichia coli* O157: H7, Lysozyme-Xanthan conjugate, *Staphylococcus aureus*, Ultrafiltered white cheese

* Corresponding Author E-Mail Address: j_hesari@yahoo.com