# بررسی زنده‌مانی فرم‌های آزاد و کپسوله شده باکتری‌های *L. acidophilus* و *L. casei* در پنیر کوارک پروبیوتیک و مقایسه اثر آنها بر خواص شیمیایی و حسی پنیر در طول نگهداری

مارال سلطان‌زاده[1]، سیدهادی پیغمبردوست[2*]، جواد حصاری[2]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
۲- استاد تکنولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
**(تاریخ دریافت: ۹۸ /۰۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۱۵)**

## چکیده

هدف این مقاله بررسی زنده مانی فرم‌های آزاد و کپسوله*لاکتوباسیلوس کازئی* (LC) و*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (LA) در پنیر کوارک پروبیوتیک و مقایسه اثر آنها بر خواص شیمیایی و حسی پنیر در طول زمان نگهداری بود. نتایج نشان داد که با گذشت زمان در طی نگهداری pHو اسیدیته قابل تیتر پنیر به ترتیب کاهش و افزایش یافت. نرخ کاهش pHدر پنیر حاوی فرم‌های آزاد LC(LC-free) بیشتر از پنیر حاوی فرم آزاد LA(LA-free) و آن هم بیشتر از نمونه کنترل و پنیر حاوی فرم‌های کپسوله هر دو باکتری (LA-cap و LC-cap) بود. روند افزایش اسیدیته قابل تیتر پنیر در روزهای نگهداری همانند روند کاهش pH آنها بود. مقدار ازت محلول در پنیر LC-free به طور معنی داری در طول نگهداری افزایش یافت. اما این افزایش در نمونه کنترل و پنیرهای حاوی LA-free، LA-cap و LC-cap به‌طور غیرمعنی‌دار بود. در هفته اول نگهداری مقدار اسیدهای چرب آزاد (اندیس لیپولیز) همه نمونه‌ها تقریبا یکسان بود. از روز چهاردهم نمونه کنترل و نیز پنیر حاوی فرم‌های کپسوله هر دو نوع پروبیوتیک نسبت به پنیر حاوی فرم‌های آزاد پروبیوتیک LC و LA اندیس لیپولیز بیشتری نشان دادند.با افزایش زمان نگهداری، امتیاز ویژگی‌های بافت، احساس دهانی، طعم و مزه و پذیرش کلی کاهش قابل ملاحظه‌ای یافتند. از بین سویه‌های پروبیوتیک، سویه LC-free در مدت زمان نگهداری تا هفته دوم بهترین پروفایل طعمی و بالاترین امتیاز پذیرش کلی را ارائه نمود. زمان ماندگاری پنیر تا ۱۴ روز اثر معنی‌داری ($p<0.05$) بر کاهش تعداد پروبیوتیک‌ها در فرم آزاد هر دو نوع باکتری نداشت. اما با گذشت زمان از ۱۴ به ۲۱ روز تعداد فرم‌های آزاد هر دو نوع باکتری کاهش معنی‌داری ($p<0.05$) نشان داد. اما قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها به فرم کپسوله در همه زمان‌های نگهداری حفظ شد.

**کلید واژگان:** پنیرنرم، خواص،کیفیت، باکتری های پروبیوتیک، کپسوله کردن

* مسئول مکاتبات: peighambardoust@tabrizu.ac.ir

## ۱- مقدمه

پنیر کوارک نوعی پنیر تازه با منشأ اروپای مرکزی است که از انعقاد اسیدی شیر توسط کالچرهای باکتریایی مناسب (*استرپتوکوکوس کرموریس و لئوکنوستوک سیتروروم*) با افزودن کمی رنت (جهت جداسازی بهتر کوآگوله‌های پروتئینی از آب پنیر و به تبع آن افزایش راندمان) تولید می‌شود. پنیر کوارک حاوی ٦٠ تا ٨٠ درصد رطوبت، ماده خشک آن حاوی ١ تا ٤٠ درصد چربی بوده و قسمت اعظم باقیمانده ماده خشک حاوی پروتئین (که ٨٠ درصد آن را کازئین تشکیل می دهد)، کلسیم و فسفات است. در مقایسه با اکثر پنیرهای رسیده، کوارک دارای ماده‌ی خشک کم‌تری است به دلیل این که بیشتر کلسیم آن در طول انعقاد اسیدی محلول شده و با آب پنیر حذف می‌شود [١].

در بین انواع مختلف پنیر، پنیرهای تازه مانند کوارک به دلیل داشتن محتوی رطوبتی بالا، چربی نسبتا بالا، نمک پایین، ظرفیت بافری مطلوب و در نهایت زمان ماندگاری محدود آن محیط مناسبی برای حفظ و انتقال پروبیوتیک‌ها محسوب می‌شود[٢-٦]. از اثرهای سودمند و سلامت بخش مربوط به مصرف پروبیوتیک‌ها می‌توان فعالیت ضد میکروبی، جلوگیری و درمان اسهال، تسکین علائم مربوط به عدم تحمل لاکتوز، فعالیت ضد عفونی کنندگی و ضد سرطان بودن، تحریک سیستم ایمنی، افزایش سلامت مجاری ادرار و بهینه سازی تأثیر واکسن را نام برد[٧-٩]. میکروارگانیسم‌های مختلفی به دلیل پتانسیل پروبیوتیک بودنشان به فراورده‌های لبنی اضافه می‌شوند. جنس‌های *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* انواع متداول باکتریایی هستند که به عنوان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک برای تولید فراورده‌های شیری تخمیری استفاده می‌شوند[١٠، ١١].

هدف نهایی در طراحی و توسعه محصولات پروبیوتیک حفظ تعداد لازم میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک هم در طول مدت زمان نگهداری محصول و هم در زمان مصرف محصول و انتقال آن از سیستم گوارشی است طوری‌که مزایای سلامت بخشی مورد ادعای این میکروارگانیسم‌ها تأمین شود[١٢].هرچند که محصولات لبنی بستر مناسبی برای انتقال باکتری‌های پروبیوتیک به بدن انسان درنظر گرفته می‌شوند اما موانع تکنولوژیکی چندی مانند عدم انتخاب سویه‌های مناسب پروبیوتیک، اسیدیته، pH، مقدار نمک، نوع بسته بندی (حضور یا عدم حضور اکسیژن)، هیدروژن پراکساید، زمان رسیدن، شرایط و دمای نگهداری پنیر می‌تواند کارایی تولید و استفاده از این محصولات را کاهش دهد[٣، ٤].بقاء میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک معیار بسیار مهمی در انتخاب و کاربرد آنها در طراحی، فرمولاسیون و توسعه محصولات پروبیوتیک است. روش‌های متعددی برای افزایش مقاومت این میکروارگانیسم‌های حساس در برابر شرایط نامساعد محیطی و سیستم گوارشی بدن پیشنهاد شده که شامل انتخاب سویه های مقاوم به اسید و صفرا، استفاده از ظروف بسته بندی غیر قابل نفوذ به اکسیژن، انجام عملیات دو مرحله‌ای تخمیر و سازگار کردن به استرس، افزودن مواد مغذی مانند اسیدهای آمینه و پپتیدها و بالاخره روش کپسوله کردن می‌باشد[١٣].کپسوله کردن باکتری‌های پروبیوتیک در داخل گویچه‌های هیدروکلوئیدی یکی از روش‌های اخیر مورد مطالعه برای بهبود فعالیت و افزایش قابلیت زنده مانی این سلول‌های میکروبی در برابر شرایط نامطلوب است[١٤]. با به دام انداختن سلول‌ها در داخل ماتریکس گویچه‌ای باعث محافظت آنها در برابر شرایط نامناسب محیطی و همچنین در برابر حمله باکتریوفاژها می‌شود[١٥].

پنیر به علت داشتن ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی خاص در مقایسه با سایر محصولات لبنی تخمیر شده مانند ماست، از جمله pH بالاتر و اسیدیته قابل تیتر کم‌تر، ظرفیت بافری بالاتر، محتوای چربی بیشتر، مواد مغذی بالاتر و بافت متراکم‌تر، پتانسیل خوبی برای انتقال میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در روده انسان دارد. پنیر همچنین ظرفیت بافری بالاتری نسبت به ماست داشته که حالت بافری در مقابل محیط بسیار اسیدی دستگاه گوارش ایجاد کرده و بنابراین محیط مناسبی برای بقای پروبیوتیک‌ها در طول عبور از دستگاه گوارش مهیا می‌سازد. علاوه بر این ماتریکس متراکم و محتوای چربی نسبتا بالای پنیر در طول مصرف آن باعث محافظت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در طول مسیر گوارش می‌شود [١٦، ١٧]. مجموعه این عوامل باعث افزایش پایداری و بقای پروبیوتیک‌ها در پنیر می‌شوند. فراورده‌های لبنی مانند پنیر امروزه به‌عنوان بستری مناسب برای انتقال باکتری‌های پروبیوتیکی مفید برای سلامت انسان مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند [١٨]. برخی از لاکتوباسیل ها،از جمله لاکتوباسیل‌های تولیدکنندهاگزوپلیساکاریددرصنعتغذانیز به

عنوان قوام دهنده، ویسکوز کننده، پایدار کننده، امولسیون کننده یا بافت دهنده به کار می‌روند [۱۹].

با توجه به مزایای پنیر کوارک نسبت به سایر محصولات لبنی تخمیری و سایر پنیرهای سنتی در حفظ و انتقال پروبیوتیک‌ها به بدن انسان در این پژوهش پنیر کوارک به عنوان محصول لبنی جهت افزودن باکتری‌های پروبیوتیکی انتخاب شد. طبق اطلاعات موجودما، تاکنون پژوهشی در ایران در زمینه مطالعه اثر کپسوله کردن بر میزان بقاء این باکتری‌ها در پنیر کوارک و نیز مقایسه اثر فرم آزاد و کپسوله باکتری‌های پروبیوتیک در پنیر کوارک گزارش نشده است. لذا هدف از این مطالعه ارزیابی خواص شیمیایی و حسی پنیر کوارک پروبیوتیک تلقیح شده با فرم‌های آزاد و کپسوله دو نوع سویه میکروبی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* در طول زمان نگهداری است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مراحل تولید پنیر کوارک

شیر پس‌چرخ پاستوریزه (با چربی ۰/۲ درصد، پروتئین ۳/۱ درصد، ماده خشک بدون چربی ۸/۵ درصد، اسیدیته ۱٤/۰ درجه دورنیک و pH ٦/۸۱) در دمای خنک از کارخانه لبنیاتبلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده و در ظرف استیل همزمان با هم زدن مداوم روی هیتر مگنت‌دار تا دمای ۳۷ الی ٤۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. استارتر کالچر پنیر با نام تجاری CHOOZITMA 11 LYO 125 DCUتهیه شده از شرکت دانیسکو (فرانسه)به مقدار ۲۲/۸٦ میلی گرم برای هر کیلوگرم شیر در دمای فوق به آن اضافه گردید. حدود ۱۲۰ دقیقه بعد از افزودن استارتر (تا رسیدن pH شیر به ٦/۳) مایه پنیر یا رنت با نام تجاری-CHY MAXPowder Extra NBتهیه شده از شرکت پیشگامان پخش صدیق (تهران) به آن اضافه و بخوبی مخلوط شد. برای این منظور مقدار وزنی ۰/۱ گرم رنت پودری در ۱۲۵ میلی لیتر آب مقطر همگن شده و از سوسپانسیون حاصل ۱/۵ میلی لیتر به ازاء هر کیلوگرم شیر افزوده شد. شیر مایه زنی شده در ظروف استیل بدون تکان دادن به مدت ۱٤ تا ۱٦ ساعت در دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن pH به ٤/٦ انکوبه شد. در پایان این مرحله دلمه بسته شده توسط چاقوی برش تیز برش داده شد و سپس دلمه پنیر از آب پنیر جداسازی گردید. برای این منظور قطعات برش داده شده دلمه در کیسه‌های پارچه ای مخصوص پنیر ریخته شده و در محیط آزمایشگاه به مدت ٤ ساعت آویزان شد تا آب پنیر آن خارج گردد. برای خروج کامل آب پنیر از دلمه آبگیری شده، دلمه در کیسه پارچه ای بمدت ۸ ساعت زیر پرس (استفاده از صفحات استیل و وزنه) قرار گرفته تا حداکثر خروج آب پنیر انجام شود. در مرحله بعد، دلمه پنیر از کیسه پارچه‌ای خارج گردیده و در ظروف استیل با خامه لبنی (به مقدار ۲۰ ٪ وزنی–وزنی پنیر) و نمک (۲ ٪ وزنی–وزنی پنیر) بخوبی مخلوط گردید. با توجه به چربی خامه (۳۵ درصد وزنی/وزنی) با افزودن ۲۰ درصد خامه، درصد چربی کل قابل محاسبه در پنیر حدود ۷ درصد بود. پنیر کوارک حاصله در کیسه‌های زیپ لاک بسته بندی شد و تا زمان آزمون‌های مربوطه در دمای یخچال نگهداری گردید.

تولید پنیر کوارک پروبیوتیک همانند مراحل فوق انجام شد با این تفاوت که به همراه استارتر کالچر تجاری، سویه‌های پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* (FD-DVS nu-trish LA-5) و *Lactobacillus casei*(FD-DVS nu-trish L.casei-431)ساخت شرکت CHR Hansen تهیه شده از شرکت پیشگامان پخش صدیق (تهران) در مرحله افزودن استارتر اضافه شد. هر کدام از باکتری‌های پروبیوتیک در دو فرم آزاد و کپسوله شده تحت شرایط یکسانی به پنیر اضافه شدند. طبق بروشور شرکت سازنده، مقدار باکتری‌های پروبیوتیک ۲۵ میلی‌گرم میکروارگانیسم بازاء هر کیلوگرم شیر اضافه شد. پنج تیمار پنیر کوارک کنترل (ctrl) (بدون سویه پروبیوتیک)، پنیر حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در فرم آزاد (LA-free)و کپسوله شده (LA-cap) و *لاکتوباسیلوس کازئی* در فرم آزاد (LC-free)و کپسوله شده (LC-cap)در یک روز تحت شرایط یکسان تولید شده و ویژگی‌های شیمیایی، حسی آنها و میزان بقاء پروبیوتیک‌ها در روزهای نگهداری ۱، ۷، ۱٤ و ۲۱ روز مورد بررسی قرار گرفت.

### ۲-۲- کپسوله کردن باکتری‌های پروبیوتیک

برای کپسوله کردن سلول‌های باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (LA) و *لاکتوباسیلوس کازئی*(LC) از ماتریکس آلژینات سدیم

با روش توضیح داده شده توسط Sheu و همکاران با اندکی تغییرات به شرح ذیل استفاده گردید[۲۰].ابتدا محلول ۳ درصد (وزنی/حجمی) آلژینات سدیم تهیه شد که متعاقب آن با اتوکلاو کردن (در ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۵ دقیقه) استریل گردید، و بلافاصله دمای آن تا حدود ٤٠ درجه سانتی‌گراد خنک گردید. ۲۰ میلی‌لیتر از محلول سدیم آلژینات با ٤ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلول باکتریایی (با شمارش حدود $10^{11}$ cfu/mg) در یک لوله سانتریفیوژ ٤٠ میلی‌لیتری منتقل و بخوبی مخلوط و یکنواخت شد. مخلوط سدیم آلژینات و سلول‌های باکتریایی حاصله بصورت قطره قطره به فاز روغنی (۱۰۰ میلی‌لیتر روغن سویا به همراه امولسیفایر Tween 80 در حال بهم زدن روی یک مگنت مخلوط‌کن اضافه گردید. در طول ۵ دقیقه مخلوط‌کردن امولسیون کدر یکنواختی حاصل شد که بلافاصله با افزودن ۱۰۰ میلی‌لیتر کلرید کلسیم (۰/۱ مولار)، امولسیون مزبور شکسته شده و میکروکپسول‌های آلژیناتی حاوی سلول‌های باکتری سخت شده بدست آمد.برای جداکردن میکروکپسول‌ها از سانتریفوگاسیون ملایم بمدت ده دقیقه استفاده شد. سپس کپسول‌ها با آب مقطر شسته شدند. کپسول‌های بدست آمده در دمای یخچال تا زمان تلقیح به پنیر نگهداری شدند.

## ۲-۳- آزمون‌های شیمیایی پنیر

### ۲-۳-۱- اندازه‌گیری pH

اندازه گیری pH با روش استاندارد ملی ایران به شماره۲۸۵۲ انجام شد[۲۱].

### ۲-۳-۲- اندازه‌گیری اسیدیته قابل تیتر

برای تعیین اسیدیته قابل تیتر پنیر، به مقدار ۵ گرم پنیر داخل ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری، مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر آب اضافه گردید. پس از همگن کردن نمونه، روی آن ٦ قطره محلول ۱٪ فنل فتالئین به عنوان شناساگر اضافه گردید. سپس نمونه با محلول هیدروکسید سدیم (NaOH) ۰/۱نرمال تا ظهور رنگ صورتی پایدار تیتر شد و اسیدیته قابل تیتر بر حسب درصد اسید لاکتیک محاسبه گردید[۲۲].

### ۲-۳-۳- اندازه‌گیری ازت محلول(شاخص شدت پروتئولیز اولیه)

روش‌های مختلفی برای ارزیابی نرخ پروتئولیز در پنیر وجود دارد. این روش‌ها شامل روش‌های عمومی (درصد ازت محلول در آب و درصد ازت محلول در pH=4، ازت غیرپروتئینی) و روش اختصاصی (الکتروفورز) است. در روش‌های عمومی پیشرفت پروتئولیز براساس درجه تجزیه کازئین‌ها ارزیابی می‌شود. مقدار تجزیه کازئین‌ها به صورت پروتئولیز اولیه و ثانویه مورد بررسی قرار می‌گیرد. برای ارزیابی پروتئولیز اولیه درصد ازت محلول در آب و درصد ازت محلول در pH=4.6 محاسبه می‌شود. برای بررسی شاخص رسیدن پنیر معمولا نسبت ازت محلول به ازت کل مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. برای ارزیابی پروتئولیز ثانویه درصد ازت محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۲٪ اندازه گیری می‌شود که به این شاخص ازت غیرپروتئینی[1] گفته می‌شود. با توجه به اینکه پنیر کوارک جزو پنیرهای تازه (نارس) با رطوبت بالا است تغییرات پروتئولیتیک خیلی بارز مورد انتظار نبود، لذا فقط به ارزیابی شاخص پروتئولیز اولیه یا همان اندازه‌گیری درصد ازت محلول در پنیرها پرداخته شد. تغییرات این شاخص نشان دهنده تجزیه اولیه کازئین پنیر است. آماده‌سازی و استخراج ازت محلول در pH= ٤/٦طبق روش اصلاح شده Kuchroo& Foxصورت گرفت[۲۳].

### ۲-۳-٤- اندازه‌گیری درصد اسیدهای چرب آزاد[2] پنیر (شاخص شدت لیپولیز)

وجود اسیدهای چرب آزاد در پنیر معیاری از دامنه لیپولیز چربی شیر بوده و این معیار به‌عنوان شاخص لیپولیز مورد استفاده قرار گرفته و با واحد درصد اسید اولئیک بیان می‌شود. رخ دادن شدید واکنش‌های لیپولیز در طول نگهداری پنیر باعث کاهش زمان ماندگاری محصول و ایجاد بد طعمی در پنیر می‌شود. برای تعیین مقدار کل اسیدهای چرب آزاد نمونه‌های پنیر از روش Nouiraو همکاران با اندکی تغییرات استفاده شد[٢٤]. اساس این روش استخراج چربی از مقدار معینی پنیر و تعیین درصد اسیدهای چرب آزاد آن با روش تیتراسیون در مقابل یک قلیای استاندارد بود. برای این منظور حدود ۵ گرم نمونه پنیر در یک لوله مدرج درپوش دار ٦٠ میلی لیتری توزین شد. روی آن ۵ میلی لیتر آب اضافه شد تا پنیر سوسپانسه گردد. سپس به آن ۱۰ میلی لیتر

1. Non Protein Nitrogen (NPN)
2. Free Fatty Acids (FFA)

مخلوط استخراج شامل ایزوپروپانول (۲-پروپانول)، پترولیوم اتر و اسید سولفوریک ٤ نرمال به نسبت به ترتیب ٤٠ به ١٠ به ١ اضافه شد. سپس مقدار ٦ میلی‌لیتر پترولیوم اتر اضافی هم به مخلوط افزوده شد. درپوش لوله‌ها بسته شده و در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ١٠ دقیقه متعادل گردید. سپس مخلوط داخل لوله به شدت به‌مدت ٢٠ ثانیه تکان داده شد. سپس لوله‌ها به‌منظور جدا شدن لایه فوقانی نگه داشته شده (به‌مدت ٥ تا ١٠ دقیقه) و لایه چربی رویی (حدود ٥ میلی‌لیتر) جدا شده و به ارلن مایر ٥٠ میلی‌لیتری منتقل گردید. روی آن دو قطره معرف آلفا نفتول فنل فتالئین[1] متانولی (١ گرم آلفا نفتول فنل فتائین در ١٠٠ میلی‌لیتر متانول) اضافه شد و محتویات ارلن با محلول پتاس (KOH) متانولی ٠/٠٢ نرمال تیتر گردید. تیتراسیون یکبار دیگر برای لوله شاهد (بدون نمونه) انجام شد. سپس درصد اسیدهای چرب آزاد پنیر کوارک از رابطه (١) محاسبه گردید:

رابطه (١)

درصد اسیدهای چرب آزاد پنیر کوارک

$$= \frac{(mL\ KOH\ for\ sample - ml\ KOH\ for\ Blank) \times N \times 100}{Weight\ of\ Fat\ (g)}$$

## ٢-٤- شمارش باکتری‌های پروبیوتیک

برای تهیه رقت از نمونه‌های پنیر، مقدار ٥ گرم پنیر همگن شده در کیسه‌های زیپ‌دار استریل حاوی ٤٥ میلی‌لیتر سیترات سدیم ٢ ٪ توزین و همگن گردید. سری رقت‌ها با افزایش یک میلی‌لیتر از هر رقت به ٩ میلی‌لیتر آب پپتونه ٠/١ درصد استریل تهیه شد. باکتری‌های پروبیوتیک در محیط کشت MRSbileagar با روش پورپلیت کشت داده شدند. گرمخانه گذاری پلیت‌ها در شرایط هوازی در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد به مدت ٧٢ ساعت انجام شد[٢٥].

## ٢-٥- ارزیابی ویژگی‌های حسی پنیر کوارک

نمونه‌های پنیر کوارک از لحاظ خصوصیات حسی رنگ، سطح پنیر، بافت پنیر، احساس دهانی، طعم و مزه و پذیرش کلی پنیر با استفاده از پانل ارزیابی حسی آموزش دیده متشکل از دانشجویان کارشناسی ارشد و دکتری علوم و صنایع غذایی به روش محصول‌گرا برای تعیین شدت پذیرش ویژگی‌های حسی بر اساس ٥ سطح پذیرش به ترتیب ١: خیلی ضعیف، ٢: ضعیف، ٣: متوسط، ٤: خوب و ٥: خیلی خوب انجام شد.در ارزیابی حسی، صفات مختلف مورد ارزیابی بر اساس اهمیت شان با ضرایبارائه شداند و مجموع ضرایب عدد ٢٠ بود. برای محاسبه نمره ارزیابی نهایی هر نمونه، مجموع امتیازات با احتساب ضریب آن بر عدد بیست (مجموع ضرایب) تقسیم گردید.ارزیابی حسی در روز تولید (روز اول)، هفتم، چهاردهم و بیست و یکم نگهداری پنیر انجام شد. نمونه‌های پنیر در ظروف پلی اتیلنی درپوش دار در دمای یخچال نگهداری شدند و بعد مورد ارزیابی حسی قرار گرفتند.

## ٢-٦- تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی تأثیر افزودن سویه‌های پروبیوتیک *لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتو باسیلوس کازئی* بر ویژگی‌های مختلف پنیرکوارک در زمان‌های مختلف نگهداری از طرح کاملا تصادفی (CRD[2]) استفاده شد. برای تعیین معنی‌دار بودن یا نبودن داده‌ها مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح معنی داری $p<0.05$ استفاده شد. نرم افزار مورد استفاده SPSS انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

# ٣- نتایج و بحث

## ٣-١- تغییرات pH نمونه‌های پنیر

جدول ١ تغییرات pHرا در تیمارهای آزمایشی به ازای زمان‌های نگهداری نشان می‌دهد. در روز اول تفاوت محسوسی در pH نمونه‌ها وجود نداشت و pH پنیرها مشابه مقدار آن در دلمه تازه بسته شده (pH=4.6) بعد از مدت زمان گرمخانه گذاری بود. البته در نمونه‌های پروبیوتیک آزاد هر دو سویه باکتریایی مقدار pH اندکی پایین تر (pH=4.52-4.54) از نمونه کنترل (pH=4.58) بود، اما این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار (P<0.05) نبود. pH نمونه‌های کپسوله شده نیز در روز اول همانند نمونه‌های پروبیوتیک آزاد بود. به ازای افزایش زمان نگهداری تفاوت pH بین نمونه‌های پروبیوتیک با کنترل افزایش یافت. در روزهای هفتم و چهاردهم بین نمونه کنترل و LA(در

1. Methanolic alpha-naphtholphthalein

2. Completely Randomized Design

هـر دو فـرم آزاد و کپـسوله)از لحـاظ تغییـرات pH تفـاوت معنـی‌داری نبـود، امـا نمونـه LC-free بـه طـور معنـی‌دار pH پایین‌تری نسبت به نمونهLC-cap و دو نمونه LA داشت. دلیـل این امر احتمـالا مربـوط بـه اثـر فـرم آزاد بـاکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* نسبت به باکتری دیگر و نیز فرم‌های کپسوله شده باکتری‌هـا برای تولید اسید لاکتیک بیشتر در پنیر بـود.در روز بیـست و یکـم نگهداری تفاوت بین نمونه‌هـای پروبیوتیـک (در فـرم آزاد) کـاملا معنی‌دار شد و به ترتیب نمونه‌هـای LC-free، LA-free، LC-cap، LA-cap و کنترل دارای کمترین pH بودند و این تفـاوت معنی‌دار ($p<0.05$) بود.

**Table 1** Variation of pH and titratable acidity of control cheese (ctrl) and probiotic cheese samples prepared from LC-free, LC-cap, LA-free and LA-cap bacteria during different storage times.

| Acidity (% Lactic acid) | | pH | | Storage (day) | Treatments |
|---|---|---|---|---|---|
| SD | Mean | SD | mean | | |
| 0.010 | 0.68d | 0.04 | 4.58a | 1 | Ctrl |
| 0.009 | 0.72c | 0.04 | 4.52a | 7 | |
| 0.008 | 0.80b | 0.03 | 4.39b | 14 | |
| 0.010 | 0.86a | 0.04 | 4.30c | 21 | |
| 0.010 | 0.69d | 0.03 | 4.52a | 1 | LC-free |
| 0.006 | 0.75c | 0.02 | 4.40b | 7 | |
| 0.007 | 0.85b | 0.02 | 4.30c | 14 | |
| 0.008 | 0.92a | 0.03 | 4.10d | 21 | |
| 0.010 | 0.69d | 0.05 | 4.55a | 1 | LC-cap |
| 0.020 | 0.72c | 0.04 | 4.52a | 7 | |
| 0.008 | 0.81b | 0.03 | 4.41b | 14 | |
| 0.009 | 0.86a | 0.04 | 4.30c | 21 | |
| 0.020 | 0.68d | 0.02 | 4.54a | 1 | LA-free |
| 0.005 | 0.72c | 0.04 | 4.50a | 7 | |
| 0.003 | 0.82b | 0.03 | 4.35b | 14 | |
| 0.005 | 0.88a | 0.05 | 4.20c | 21 | |
| 0.009 | 0.68d | 0.03 | 4.54a | 1 | LA-cap |
| 0.010 | 0.71c | 0.05 | 4.53a | 7 | |
| 0.040 | 0.80b | 0.04 | 4.43b | 14 | |
| 0.070 | 0.85a | 0.06 | 4.32c | 21 | |

Data are mean of triplicate measurements ± SD, different letters for each sample in each column correspond to significant ($p<0.05$) differences between means.

در همه نمونه هـای پنیـر، بـه ازای زمـان نگهـداری pH بـه‌طـور معنی‌داری ($p<0.05$) کاهش یافـت. البتـه نـرخ ایـن کـاهش در نمونـه‌هـای آزاد LC بیـشتر از فـرم آزاد LA و آن هـم بیـشتر از فرم‌های کپسوله باکتری‌ها بود. در بـین سـویه‌هـای پروبیوتیـک در همه زمان‌های نگهداری نمونهLC-free کمترینpH را نسبت بـه سایرین داشت. نمونه LC-free نسبت به LA-free نیز توانـایی تولید اسید بیشتری داشته و باعـث کـاهش بیـشتر pH پنیـر شـد. کپسولاسیون باکتری‌های پروبیوتیک باعث شد کـه فعالیـت تولیـد اسید آنها در طول نگهداری پنیر کاهش یابد.

pH از عواملی است که تأثیر زیـادی بـر پایـداری پنیـر و شـرایط رشد میکروارگانیسم‌ها، فعالیـت آنزیمـی و سـرعت واکـنش‌هـای بیوشـیمیایی در طـی رسـیدنپنیر دارد. کـاهش pH طـی دوره رسیدنبیشتر مربوط به تخمیر لاکتوز و تـا حـدودی در زمـان‌هـای طولانی رسیدن پنیر های سنتی مربوط به تولید اسـیدهای آمینـه و اسیدهای چرب در اثر پروتئولیز و لیپولیز می‌باشد، اما عامـل مهـم در کاهش pH مربوط بـه تولیـد اسـید لاکتیکاسـت[۲۶]. کـاهش سـریع در مقـدار pH طـی مراحـل اولیـه در تهیـه پنیریـک اصـل ضروری برای تشکیل لخته و پیش‌گیریا کاهش رشـد میکروفلـور نامطلوب در صنعت پنیرسازی است[۲۷]. در مطالعه خواص پنیـر کوارک پروبیوتیک تلقیح شده بـا *بیفیـدوباکتریوم لانگـوم* گـزارش شده کهpHپنیر پروبیوتیک بـه‌طـور معنـی‌داری نـسبت بـه نمونـه کنترل پایین‌تر بود[۲].همچنین نگهداری پنیر کوارک به مـدت ۱۰

روز باعث کاهش pH نمونه‌های پنیر شد. این محققان علت کاهش pH را تخمیر لاکتوز به اسید لاکتیک و اسیدهای چرب آزاد عنوان کردند که در پنیر کوارک پروبیوتیک نگهداری شده، توسعه یافتند. همچنین این محققان گزارش کردند که مقادیر اسید لاکتیک و اسید استیک در پنیر کوارک پروبیوتیک نسبت به نمونه کنترل در پایان زمان نگهداری بیشتر بود. این افزایش هم‌راستا با کاهش مقدار لاکتوز نمونه‌های پنیر در طول زمان نگهداری بود.

## ۳-۲- تغییرات اسیدیته قابل تیتر نمونه‌های پنیر

در جدول ۱ تغییرات اسیدیته نمونه‌های پنیر کوارک پروبیوتیک آزاد و کپسوله در طول زمان نگهداری نشان داده شده است. در همه نمونه‌های پنیر، به ازای زمان نگهداری از روز اول تا بیست و یکم، اسیدیته به‌طور معنی‌داری ($p<0.05$) افزایش یافت. روند افزایش اسیدیته نمونه‌های پنیر در روزهای نگهداری همانند روند کاهش pH در آنها بود. در واقع در هر دو سویه آزاد*لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* توسعه اسیدیته و به تبع آن کاهش pH در زمان نگهداری پنیر احتمالا در اثر تخمیر لاکتوز و تولید اسید لاکتیک بیشتر از نمونه کپسوله شده و نمونه کنترل (فاقد سویه پروبیوتیک) بود. هر چند که در نمونه‌های کپسوله و کنترل هم روند افزایش اسیدیته در طول زمان کاملا شاخص بود. بنظر می‌رسد با توجه به اینکه پنیر کوراک جزو پنیرهای نرم بوده و رطوبت بالایی دارد و نیز مقدار نمک آن در مقایسه با پنیرهای سنتی ناچیز است، زمینه برای رشد و فعالیت باکتری‌های استارتری و پروبیوتیکی بیشتر از پنیرهای سنتی که دارای ماده خشک و نمک بیشتری هستند، مهیا است. گزارش شده که نوع میکروارگانیسم‌های مورد استفاده، دما و زمان رسیدن تأثیر متقابلی بر توسعه اسیدیته پنیر دارد[۲۸]. بنظر می‌رسد که با توجه به اینکه در تولید پنیر کوارک در این پژوهش سویه‌های پروبیوتیک به همراه استارتر کالچر تجاری بطور همزمان مورد استفاده قرار گرفته‌اند لذا اثر تخمیری آنها روی لاکتوز و تولید اسید لاکتیک در نمونه‌های پنیر پروبیوتیک بیشتر از نمونه کنترل بود.

## ۳-۳- تغییرات ازت محلول نمونه‌های پنیر

جدول ۲ نتایج اندازه‌گیری ازت محلول (شاخص پروتئولیز اولیه) تیمارهای مورد بررسی در این پژوهش را نشان می‌دهد. با توجه به اثر متقابل سویه‌های پروبیوتیک آزاد با باکتری‌های استارتری پنیر که بطور همزمان به پنیر تلقیح شدند، تغییرات ازت محلولاین سویه‌ها نسبت به زمانی که فقط از استاتر کالچر استفاده شد، افزایش یافت. در این میان، تغییرات ازت محلول سویه‌های آزاد با گذشت زمان نگهداری پنیر نسبت بهسویه‌های کپسوله بیشتربود. در همه نمونه های پنیر، به ازای زمان نگهداری تا ۲۱ روز مقدار ازت محلول به‌طور معنی‌داری ($p<0.05$) افزایش یافت. این افزایش در روزهای اول تا هفتم در مورد نمونه کنترل و پنیر حاوی LA-free، LA-cap و LC-cap با شدت کمتری (به‌طور غیرمعنی‌دار) بود. اما درمورد پنیر LC-free از روز اول تا هفتم درصد ازت محلول افزایش معنی‌داری نشان داد. از روز هفتم تا بیست ویکم در کلیه تیمارها ازت محلول به طور معنی‌داری ($p<0.05$) زیاد شد. در مطالعه‌ای تأثیر سویه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر خصوصیات پنیر گوسفندی پاستوریزه بررسی و گزارش گردید که زمانی که پنیر بدون سویه‌های پروبیوتیک و فقط با استارتر کالچر تجاری تولید شده بود ازت محلول آن افزایش کمتری نسبت به زمانی که پنیر حاوی سویه‌های لاکتوباسیلوس بود، داشت. همچنین معلوم شد که افزایش ازت محلول پنیر در مورد سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* بیشتر از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود[۲۹].

## ۳-٤- تغییرات اسیدهای چرب آزاد (FFA) به عنوان شاخص لیپولیز در نمونه‌های پنیر

نتایج حاصل از آنالیز اسیدهای چرب آزاد در فاز چربی استخراج شده از تیمارهای پنیر در جدول ۲ نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود در روزهای اول و هفتم نگهداری مقدار اسیدهای چرب آزاد همه نمونه‌ها تقریبا یکسان بود. اما از روز چهاردهم نمونه کنترل و نیز پنیر حاوی فرم‌های کپسوله هر دو نوع پروبیوتیک نسبت به پنیر حاوی فرم‌های آزاد پروبیوتیک LC و LA اندیس لیپولیز (درصد اسیدهای چرب آزاد) بیشتری نشان دادند. همانطور که از جدول ۲ ملاحظه می‌شود، در روز بیست و یکم نگهداری نمونه‌های کنترل، LC-cap و LA-cap مقدار لیپولیز خیلی بیشتری نسبت به نمونه‌های LC-free و LA-free نشان دادند. بنظر می‌رسد که زمانی‌که میکروارگانیسم‌ها کپسوله می‌شوند در ماتریکس پنیر بحالت کپسوله شده اما بدون

فعالیت لیپولیتیکی و تأثیرگذاری بر سویه‌های استارتری قرار دارند. اما زمانی که باکتری‌های پروبیوتیک در فرم آزاد به‌طور همزمان با سویه‌های استارتر کالچر تجاری پنیر تلقیح می‌شوند مانع از فعالیت لیپولیتیکی سویه های استارتری می‌شوند، طوری‌که با گذشت زمان ماندگاری پنیر (از هفته دوم به بعد) شاخص لیپولیز پنیر کوارک کنترل و نمونه‌های حاوی پروبیوتیک‌های کپسوله شده به طور قابل ملاحظه‌ای زیادتر شد.

**Table 2**Variation of soluble nitrogen and free fatty acids of control cheese (ctrl) and probiotic cheese samples prepared from LC-free, LC-cap, LA-free and LA-cap bacteria during different storage times.

| FFA (%) | | Soluble N (%) | | Storage (day) | Treatments |
|---|---|---|---|---|---|
| SD | mean | SD | mean | | |
| 0.003 | 0.228 | 0.015 | 0.215c | 1 | Ctrl |
| 0.008 | 0.253 | 0.008 | 0.223c | 7 | |
| 0.004 | 0.362 | 0.004 | 0.241b | 14 | |
| 0.007 | 0.441 | 0.007 | 0.278a | 21 | |
| 0.008 | 0.219 | 0.010 | 0.219d | 1 | LC-free |
| 0.010 | 0.238 | 0.006 | 0.238c | 7 | |
| 0.004 | 0.241 | 0.004 | 0.259b | 14 | |
| 0.010 | 0.310 | 0.010 | 0.310a | 21 | |
| 0.004 | 0.227 | 0.005 | 0.220c | 1 | LC-cap |
| 0.008 | 0.248 | 0.010 | 0.227c | 7 | |
| 0.009 | 0.365 | 0.005 | 0.248b | 14 | |
| 0.07 | 0.450 | 0.007 | 0.280a | 21 | |
| 0.009 | 0.216 | 0.018 | 0.216c | 1 | LA-free |
| 0.005 | 0.236 | 0.005 | 0.236c | 7 | |
| 0.010 | 0.245 | 0.010 | 0.245b | 14 | |
| 0.005 | 0.286 | 0.005 | 0.286a | 21 | |
| 0.007 | 0.228 | 0.010 | 0.216c | 1 | LA-cap |
| 0.010 | 0.240 | 0.005 | 0.224c | 7 | |
| 0.008 | 0.351 | 0.010 | 0.246b | 14 | |
| 0.010 | 0.445 | 0.005 | 0.276a | 21 | |

Data are mean of triplicate measurements ± SD, different letters for each sample in each column correspond to significant ($p<0.05$) differences between means.

هیدرولیز چربی شیر طی تهیه پنیر و رسیدگی به عمل لیپازهای طبیعی شیر، آنزیم‌های لیپولیتیک باکتری‌های آغازگر و غیرآغازگر، لیپازهای باکتری‌های سایکروتروفیک نسبت داده می‌شود. این فرآیند به نوع پنیر و آنزیم‌های خارجی بستگی دارد. اسیدهای چرب تولید شده در ادامه می‌توانند به متیل کتون‌ها و تیواسترها که ترکیبات مسئول عطر و طعم هستند، تبدیل شوند[۲۷].همچنین اثر استارترهای تولید کننده اگزو پلی ساکارید بر لیپولیز پنیر UF را مورد بررسی قرار گرفته و گزارش شده که ضمن آنکه اندیس لیپولیز با گذشت زمان رسیدن پنیر افزایش یافت، اما بین باکتری‌های آغازگر مورد استفاده تفاوت معنی‌داری از حیث شدت لیپولیز وجود نداشت[۳۰]. این یافته ها ضمن تأیید نتایج بدست آمده در پژوهش ما، نتایج یافته‌های صبحی سرابی [۲۹] را نیز تأیید کرد. در این پژوهش گزارش شده که اندیس لیپولیز پنیر در نمونه‌های کنترل (فاقد سویه آغازگر) بیشتر از مقدار آن در نمونه‌های پنیر حاوی سویه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس *کازئی* و لاکتوباسیلوس *پلانتاروم*بود. نتایج ما نشان داد که در نمونه کنترل و نمونه‌های حاوی پروبیوتیک‌های کپسوله افزایش اندیس لیپولیز به ازای زمان نگهداری شدیدتر از نمونه‌های پنیر LC-free و LA-free بود.

## ۳-۵- نتایج ارزیابی ویژگی‌های حسی پنیر کوارک

مقایسه ویژگی‌های حسی نمونه‌های پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس *کازئی*در فرم‌های آزاد و کپسوله شده ( LC-free , LC-cap) و لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس*در فرم‌های آزاد و کپسوله شده (LA-free, LA-cap) در مقایسه با نمونه کنترل (Ctrl) در زمان‌های نگهداری یک هفته‌ای در شکل ۱ (A تا D) آمده است. همانطور که از شکل ۱-A ملاحظه می‌شود، در روز اول بین کلیه تیمارهای نمونه‌های پنیر از لحاظ کلیه ویژگی‌های حسی تفاوت معنی‌داری ($p<0.05$) نبود. با افزایش زمان نگهداری، در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ (شکل‌های ۱ B-D) به غیر از ویژگی‌های رنگ و سطح پنیر، در بقیه ویژگی‌های حسی، اختلاف معنی‌داری بین میانگین نتایج حاصل شد. بدین معنی که فرم‌های آزادLC در اکثر پارامترهای حسی نسبت به فرم‌های آزادLA و نیز نسبت به نمونه کنترل امتیازات حسی بالاتری کسب کردند. زمانی‌که باکتری‌ها در فرم کپسوله به پنیر تلقیح شدند، صرفنظر از نوع باکتری، امتیازهای حسی آنها مشابه امتیاز حسی نمونه کنترل بود، بدین معنی که باکتری‌های کپسوله شده فعالیت لازم برای ایجاد تغییرات احتمالی در بافت پنیر را نداشتند. در روزهای ۷ و ۱۴ بین امتیاز حسی نمونه‌های پنیر تفاوت‌هایی ایجاد شد، طوری‌که به‌غیر از شاخصه‌های رنگ و سطح پنیر، از لحاظ بقیه

پارامترها، بیشترین امتیازهای حسی به ترتیب به نمونه‌های LC-free، LC-cap، کنترل، LA-cap و LA-free اختصاص یافت. اما در روز ۲۱ نگهداری، کمترین امتیازهای حسی کلیه پارامترها به نمونه کنترل و نمونه‌های کپسوله شده هر دو باکتری اختصاص یافت. این نمونه‌ها در روز ۲۱ نسبت به پنیرهای پروبیوتیک حاوی فرم‌های آزاد باکتری، دچار کپک زدگی مشهودی شد که نتیجه منفی در ارزیابی حسی ارزیاب‌ها داشت. در روز ۲۱ نگهداری بیشترین امتیاز حسی مربوط به نمونه LC-free و بعداز آن LA-free بود.

مک سوینی و فاکس [۲۸]گزارش کردند که افزودن استارترهای الحاقی در پنیر چدار باعث بهبود خصوصیات طعمی این پنیرها نسبت به نمونه‌های بدون استارتر گردید. سویه‌های میکروبی افزوده شده به استارتر پنیر تجارتی ضمن تأثیر بر ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی پنیر، بالطبع روی خصوصیات طعمی نیز اثر مشهودی دارند. آتاسوی و تورک اوغلو [۳۱] نیز گزارش کردند که افزودن استارترهای حاوی لاکتوباسیل‌ها به پنیر سفید ترکیه‌ای باعث بهبود ویژگی‌های حسی و طعمی این پنیر گردید. صبحی سرابی [۲۹]نیز گزارش کرد که پنیر گوسفندی تلقیح شده با سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* به ترتیب بیشترین امتیازهای حسی و نمونه کنترل (بدون افزودن سویه پروبیوتیک) کمترین امتیاز حسی را به خود اختصاص داد. این محقق دلایل پایین بودن امتیاز حسی نمونه کنترل نسبت به نمونه‌های پروبیوتیک را عدم پاستوریزاسیون شیر نمونه کنترل و رشد کپک و مخمر، وجود طعم خارجی و حیوانی و نیز بافت سفت به دلیل ماده خشک بالا عنوان کرد. فعالیت بیشتر باکتری‌های پروبیوتیک در طول زمان رسیدن پنیر گوسفندی مسئول توسعه عطر و طعم مطلوب در این پنیرها بود. حصاری و همکاران [۳۲] و سینگ و وانگانا [۳۳]نیز در مطالعات خود به این نکته اشاره کرده‌اند که پروفایل طعمی پنیرهای کنترل با نمونه‌های تلقیح شده با سویه‌های میکروبی پروبیوتیک کاملا از هم متفاوت بود. سونگ و همکاران [۲]در مطالعه خواص حسی پنیر کوارک پروبیوتیک تلقیح شده با *بیفیدوباکتریوم لانگوم* گزارش کردند که امتیاز ویژگی پذیرش کلی پنیر کوارک پروبیوتیک نسبت به نمونه کنترل (بدون سویه میکروبی) به‌طور معنی داری بیشتر بود. همچنین بازاء ۱۰ روز زمان نگهداری در هر دو نمونه کنترل و پروبیوتیک امتیاز حسی پذیرش کلی کاهش قابل ملاحظه‌ای یافت.

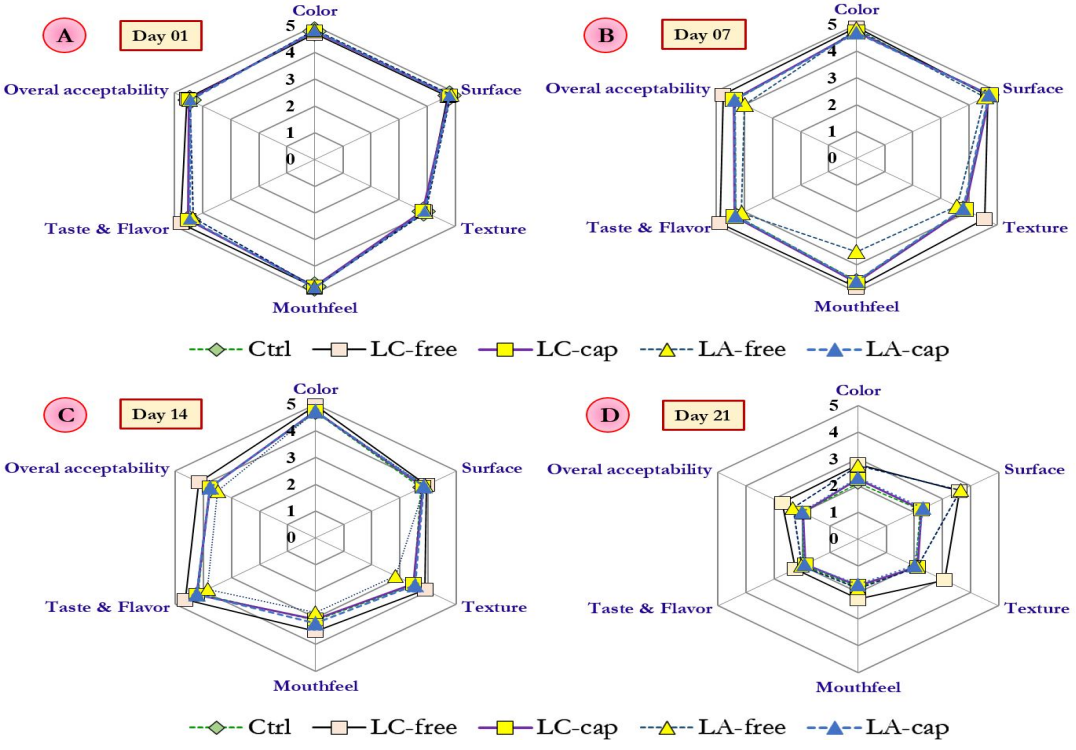

**Fig 1** Variations of sensory scores for control cheese (Ctrl) and probiotic cheese samples prepared from LC-free, LC-cap, LA-free and LA-cap bacteria during weekly intervals: days 1-21 (Figs. A-D). Data are mean of 10 panelists scores (n=10).

نتایج ارزیابی حسی نمونه‌های پنیر بازاء زمان نگهداری در شکل ۲ آمده است. با افزایش زمان نگهداری، بغیر از ویژگی‌های رنگ و سطح پنیر، امتیازهای بقیه شاخصه‌های حسی کاهش قابل ملاحظه‌ای یافتند. بخصوص در بازه زمانی ۱۴ تا ۲۱ روز در همه نمونه‌های پنیر شدیدترین کاهش در خصوصیات حسی رخ داد.

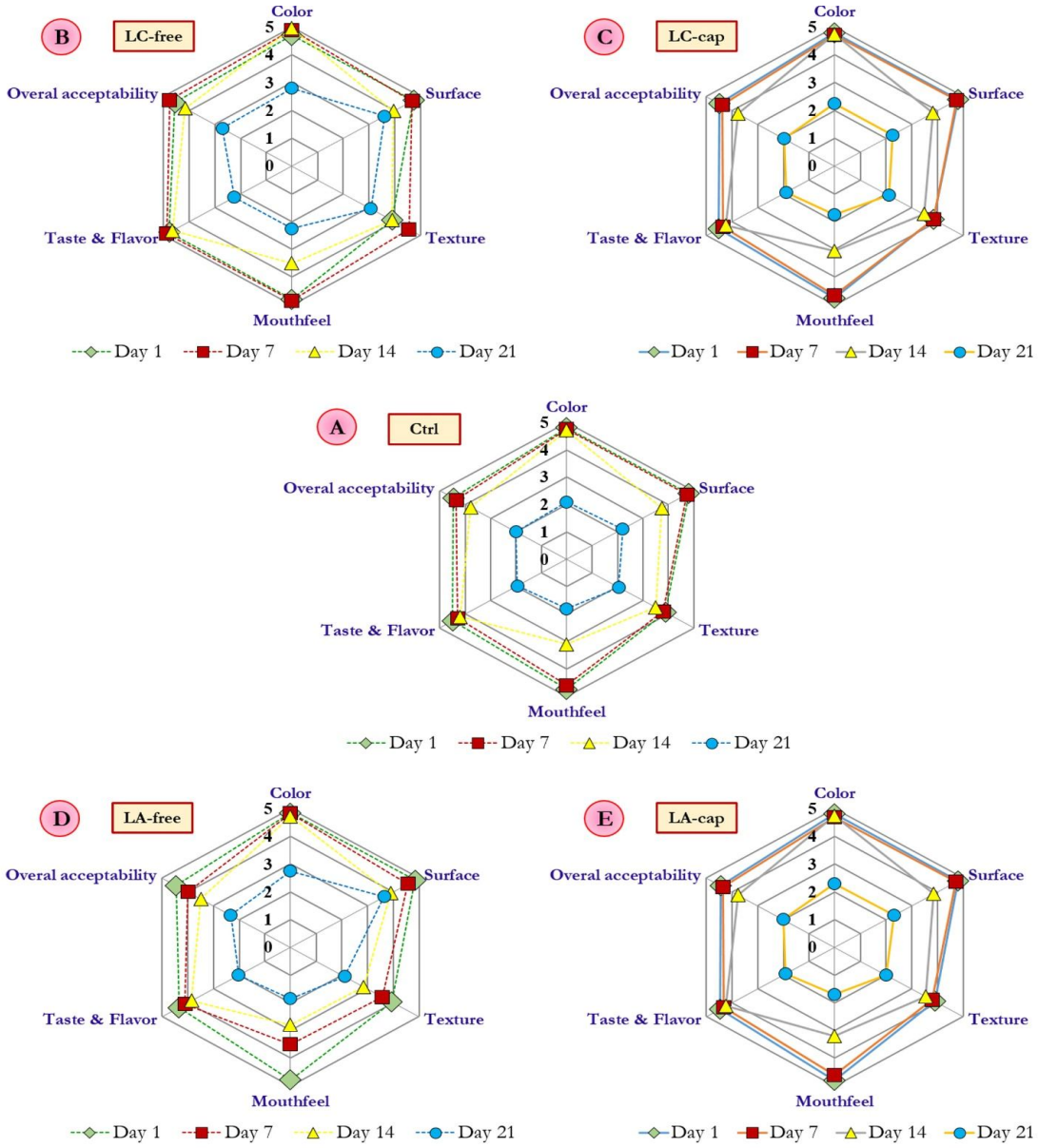


**Fig 2** Variations of sensory scores for control cheese (Ctrl) (Fig. A) and probiotic cheese samples prepared from LC-free (Fig. B), LC-cap (Fig. C), LA-free (Fig. D) and LA-cap (Fig. E) bacteria at 1st, 7th, 14th and 21st days of storage. Data are mean of 10 panelists scores (n=10).

با توجه به نتایج این مطالعه معلوم گردید که بهترین زمان نگهداری پنیر کوارک پروبیوتیک تا ۱۴ روز بود که بیشتر از این زمان باعث افت خصوصیات حسی پنیر گردید. همچنین مشخص گردید که از بین سویه های پروبیوتیک، سویه *لاکتوباسیلوس*

*کازئی* در فرم آزاد در مدت زمان مطلوب نگهداری (بین ۷ تا ۱٤ روز) بهترین پروفایل طعمی و بالاترین امتیاز پذیرش کلی را کسب نمود. بنظر می‌رسد سویه *کازئی* نسبت به سویه *اسیدوفیلوس* به دلیل فعالیت هیدرولیزی و تولید اسیدلاکتیک بیشتر (کاهش pH) بافت و خصوصیات طعمی مطلوب تری ارائه نمود که بیشتر مورد پذیرش پانلیست ها قرار گرفت. با گذشت زمان امتیاز پذیرش کلی همه نمونه‌ها کاهش یافت و مقدار این کاهش از روز ۱٤ تا ۲۱ در مورد همه نمونه‌ها بسیار شدید بود.

## ۳-٦- شمارش باکتری‌های پروبیوتیک

نتایج شمارش باکتری‌هایپروبیوتیک در نمونه‌های پنیر حاوی فرم‌های آزاد و کپسوله باکتری در روزهای نگهداری مختلف در شکل ۳ آمده است. در مورد هر دو باکتری، تعداد اولیه لاکتوباسیل‌های تلقیح شده در روز اول ۸/٦ تا ۸/۸ logCFU/g بود. همانطور که از شکل ۳ملاحظه می‌شود زمان ماندگاری پنیر تا ۱٤ روز اثر معنی‌داری ($p<0.05$) بر کاهش تعداد پروبیوتیک‌ها در فرم آزاد هر دو نوع باکتری نداشت. اما با گذشت زمان از ۱٤ به ۲۱ روز تعداد فرم‌های آزاد هر دو نوع باکتری کاهش معنی‌داری ($p<0.05$) نشان داد. اما قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها به فرم کپسوله در همه زمان‌های نگهداری حفظ شد و تعداد آنها در پایان ۲۱ روز در همان مقدار اولیه تلقیح شده ثابت ماند. در روزهای ۱٤ و ۲۱ نگهداری در مورد هر دو نوع باکتری، زنده مانی فرم آزاد به‌طور معنی‌داری ($p<0.05$) کمتر از فرم کپسوله باکتری بود.

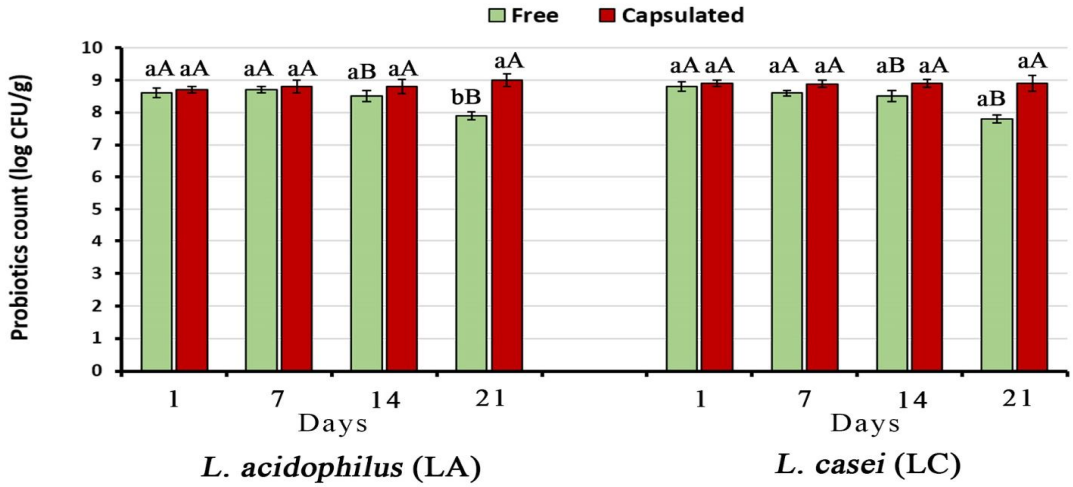


**Fig 3** Survival of free and encapsulated forms of LA and LC bacteria during different storage times of quark cheese. Data are mean of triplicate measurements (n=3). Error bars indicate SD values. Different small letters correspond to each microorganism at different storage times, and different capital letters correspond to free and encapsulated forms of bacteria at the same storage days indicate significant ($p<0.05$) difference between means.

پنیر کوارک به دلیل داشتن pH نسبتا بالا (٤/٥) (نسبت به سایر محصولات لبنی مانند ماست و دوغ)، رطوبت بالا (بالای ٦٥ درصد) و نیز چربی نسبتا بالا (حدود ۷ تا ۱۰ درصد) که نقش محافظتی بر حفظ لاکتوباسیل‌ها دارد می‌تواند بستر مناسبی برای حفظ و انتقال باکتری‌های پروبیوتیک به بدن انسان باشد. محققان متعددی گزارش کردند که تعداد لاکتوباسیل‌ها در پنیر تازه در حد قابل قبول آنها برای پروبیوتیک بودن به تعداد ۷ تا ۹ log CFU/g حفظ شده و اینکه پنیرهای تازه مانند پنیر کوارک حامل خوبی برای انتقال باکتری‌های پروبیوتیک به بدن انسان هستند[۳٤-۳٦]. همچنین گزارش شده که تعداد باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در پنیر کوارک به ازای زمان نگهداری افزایش یافت و در طول کل مدت زمان نگهداری پنیر تا ۳۰ روز تعداد سلول‌های زنده پروبیوتیک کمتر از ۷ logCFU/g نبود [٤]. این محققان همچنین گزارش کردند که فرم‌های کپسوله باکتری‌های مزبور قابلیت زنده‌مانی بیشتری نسبت به فرم‌های آزاد داشتند که با نتایج پژوهش ما مطابقت دارد. همچنین نشان داده شده که تعداد باکتری‌های پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم لانگوم* در پنیر کوارک

پروبیوتیک از ٦/٥ در زمان تلقیح به log CFU/g٦/٧ در پایان زمان نگهداری رسید[۲]. چند فاکتور هنگام افزودن باکتری‌های پروبیوتیک به مواد غذایی تخمیری مانند پنیر باید مدنظر قرار گیرد. عمدتا، تعداد باکتری‌های تلقیح شده در محصول باید طوری باشد که هنگام مصرف محصول تعداد آنها در حداکثر خود باشد تا مزایای مورد نظر از مصرف محصولات پروبیوتیک تأمین گردد[۲]. برای تأمین حداکثر مزایای پروبیوتیکی، تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در یک محصول لبنی هنگام مصرف باید حداقل $10^6$ تا $10^7$ CFU/g باشد و این محصول لبنی باید بطور منظم روزانه ۱۰۰ گرم مصرف شود[۳۷،۳۵].

## ٤- نتیجه گیری

اثر فرمهای آزاد و کپسوله باکتری LA و LC بر خصوصیات شیمیایی، حسی و زنده مانی پروبیوتیک‌ها در طول زمان نگهداری پنیر کوارک مورد مطالعه قرار گرفت. pH و اسیدیته در روز اول، بین نمونه‌های پروبیوتیک و کنترل تفاوت معنی‌داری ($p<0.05$) نداشتند. از روز هفتم نگهداری تا روز بیست و یکم pH پنیر LC نسبت به نمونه کنترل و نیز پنیر LA به طور محسوس کاهش یافت. نرخ این کاهش در فرمهای آزاد LC بیشتر از فرم آزاد LA و آن هم بیشتر از فرمهای کپسوله هر دو باکتری‌ها بود. از روز هفتم تا بیست و یکم نگهداری، اسیدیته نمونه LC نسبت به دو نمونه کنترل و LA به طور معنی‌داری ($p<0.05$) افزایش یافت. در هر دو سویه آزاد *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* توسعه اسیدیته و به تبع آن کاهش pH در زمان نگهداری پنیر احتمالا در اثر تخمیر لاکتوز و تولید اسید لاکتیک بیشتر از نمونه کپسوله شده و نمونه کنترل (فاقد سویه پروبیوتیک) بود. هر چند که در نمونه‌های کپسوله و کنترل هم روند افزایش اسیدیته در طول زمان کاملا شاخص بود. مقدار ازت محلول در همه نمونه‌های پنیر در طول نگهداری افزایش یافت. این افزایش در روزهای اول تا هفتم در مورد نمونه کنترل و پنیر حاوی LA-free، LA-cap و LC-cap به‌طور غیرمعنی‌دار بود. اما درمورد پنیر LC-free از روز اول تا هفتم درصد ازت محلول افزایش معنی‌داری نشان داد. در بررسی شاخص لیپولیز نیز معلوم شد در روزهای اول و هفتم نگهداری مقدار اسیدهای چرب آزاد همه نمونه‌ها تقریبا یکسان بود. اما از روز چهاردهم نمونه کنترل و نیز پنیر حاوی فرمهای کپسوله هر دو نوع پروبیوتیک نسبت به پنیر حاوی فرمهای آزاد پروبیوتیک LC و LA اندیس لیپولیز (درصد اسیدهای چرب آزاد) بیشتری نشان دادند. با افزایش زمان نگهداری، امتیاز ویژگی‌های بافت، احساس دهانی، طعم و مزه و پذیرش کلی کاهش قابل ملاحظه‌ای یافتند. از بین سویه‌های پروبیوتیک، سویه LC-free در مدت زمان مطلوب نگهداری (بین ۷ تا ١٤ روز) بهترین پروفایل طعمی و بالاترین امتیاز پذیرش کلی را ارائه نمود. زمان ماندگاری پنیر تا ١٤ روز اثر معنی‌داری ($p<0.05$) بر کاهش تعداد پروبیوتیک‌ها در فرم آزاد هر دو نوع باکتری نداشت. اما با گذشت زمان از ١٤ به ۲۱ روز تعداد فرمهای آزاد هر دو نوع باکتری کاهش معنی‌داری ($p<0.05$) نشان داد. اما قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها به فرم کپسوله در همه زمان‌های نگهداری حفظ شد. لذا برای حفظ کامل باکتری‌های پروبیوتیک در طول مدت نگهداری بیش از سه هفته،کپسوله کردن آنها لازم است. با توجه به نتایج این مطالعه معلوم گردید که بهترین زمان نگهداری پنیر کوارک پروبیوتیک تا ١٤ روز بود که بیشتر از این زمان باعث افت خصوصیات حسی پنیر گردید.

## ٥- منابع


[1] Schulz, D., Senge, B. &Krenkel, K. (1999). Investigations into the combined enzymatic and lactic acid milk coagulation. Milchwissenschaft, 54, 363-367.

[2] Song, M., Park, W. S., Yoo, J., Han, G., Kim, B., Seong, P., Oh, M., Kim, K. & Jam, J. (2017). Characteristics of Kwark cheese supplemented with *Bifidobacteriumlongum*KACC 91563. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 37 (5), 773-779.

[3] Milanović, S.D., Panić, M. D. &Carić, M. D. (2004). Quality of Quarg produced by probiotics application. ActaPeriodicaTechnologica, 35, 37-48.

[4] Kadiya, K.S., Kanawjia, S.K. & Solanki, A.K. (2014). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of Quarg cheese.

[16] Bergamini, C.V., Hynes, E.R., Quiberoni, A., Suarez, V.B. &Zalazar C.A. (2005). Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. Food Research International 38, 597–604.
[17] Gardiner, G., Ross, R. P., Wallace, J. M., Scanlan, F. P., Jagers, P. P.J. M., Fitzerald, G ,. Collins, J. K. & Stanton, C. (1999). Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of Cheddar cheese. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 4907-4916.
[18] Karimi, R., Sohrabvandi, S. &Mortazavian, A.M. (2012). Review Article: Sensory characteristics of probiotic cheese. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11, 437-452.
[19] Khodabakhsh, M., TajabadyEbrahimi, M &Hashemi M. (2012). Production of exopolysaccharides from *Lactobacilli* isolated from Keshk of Lighvan area. Quarterly Journal of Applied Biotechnology and Microbiology, 1(1), 83-100. [In Persian]
[20] Sheu, T.Y. & Marshall, R.T. (1993). Microentrapment of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. Journal of Food Science, 54, 557–561.
[21] ISIRI. 2006. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Milk and dairy products: Determination of fat acidity and pH.ISIRI number 2852.
[22] AOAC, Association of Official Analytical Chemist. (2000). Official methods of analysis Washington. D. C.
[23] Kuchroo, C.N. & Fox, P.F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. Michwissenchaft, 37, 331-335.
[24] Nouira, W., Park, Y.W., Guler, Z. & Terrill, T. (2011). Comparison of free fatty acid composition between low-fat and full-fat goat milk cheeses stored for 3 months under refrigeration. Open Journal of Animal Sciences, 1(2), 17-23.
[25] Oliveira, R.P.S., Florence, A.C.R., Silva, R.C., Perego, P. &Converti A. (2009). Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profile in nonfat symbiotic fermented milk. International Journal of Fermented Foods, 3(1), 61-76.
[5] Djurić, M.S., Ilićić, M.D., Milanović, S.D., Carić, M.D. &Tekić, M.N. (2007). Nutritive characteristics of probiotic Quarg as influenced by type of starter. ActaPeriodicaTechnologica 38, 11-19.
[6] Mara, O. & Kelly A.L. (1998). Contribution of milk enzymes, starter and rennet to proteolysis during storage of Quarg. International Dairy Journal, 8, 973-979.
[7] Shah, N.P. (2007). Functional cultures and health benefits. International Dairy Journal, 17(11), 1262-1277.
[8] Saad, S.M.I. (2006). Probiotics and prebiotics: the state of the art. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 42(1), 1-16.
[9] Bomba, A., Nemcova, R., Mudronova, D., &Guba, P. (2002). The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. Trends in Food Science and Technology 13(4), 121-126.
[10] Fuller, R. (1997). Probiotics 2: application and practical aspects. London: Chapman and Hall.
[11] Gibson, G.R. & Fuller, R. (1998). The role of probiotics and probiotics in the functional food concept. In: M.J. Sadler & M. Slatmarsh (Eds.), Functional foods: The consumer, the products and the evidence (pp. 3-14),
[12] Shah, N.P. &Lankaputhra, W.E.V. (1997). Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium*ssp. in yoghurt. International Dairy Journal, 7(5): 349–356.
[13] Gismondo, M. R., Drago, L. & Lombardi, A. (1999). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. International Journal of Antimicrobial Agents, 12, 287-292.
[14] Chandramouli, V., Kailasapathy, K, Peiris, P. & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus*spp in simulated gastric conditions. Journal of Microbiology Methods, 57, 27-35.
[15] Krasaekoopt, W., Bhandari, B. &Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation technique of probiotics for yoghurt: A review. International Dairy Journal, 13, 3-13.

International Journal of Microbiology, 128, 467-472.
[26] Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. &McSweeney, P.L.H. (2000). Fundamentals of cheese science. Gaithersburg, Aspen: Wiley.
[27] Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T. M., Kalantzopoulos, G. &Tsakalidou, E. (2001). Biochemical properties of *enterococci*relevant to their technological performance. International Dairy Journal, 11, 621-647.
[28] McSweeney, P.L.H. & Fox, P.F. (2004). Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, M. C. Timothy, & P. G. Timothy (Eds.) 3rd Ed.. Cheese: chemistry, physics and microbiology. (pp. 361-371). London: Elsevier Academic Press.
[29] SobhiSarabi, Y. (2012). Effects of *Lactobacillus casei*and *L. plantarum*strains isolated from traditional Lighvan cheese on pasteurized sheep's cheese. M Sc. Thesis, University of Tabriz, Tabriz, Iran. (In Persian)
[30] Zare-Jamshidi, N &Hesari, J. (2013). The effect of exopolysaccharid –producing starters on the proteolysis and lipolysis of the ultrafiltered white cheese. Food Science Research, 23(2), 249-257. (In Persian)
[31] Atasoy, A.F. &Turkoglu, H. (2008). Changes of composition and free fatty acid content of Urfa cheeses (a white-brined Turkish cheese) during ripening: Effect of heat treatments and starter cultures. Food Chemistry, 110, 598-604.
[32] Hesari, J., Ehsani, M. R., Khosroshahi, A. &McSweeney, P.L.H. (2006). Contribution of rennet and starter to proteolysis in Iranian UF white cheese. Lait, 86, 291-302.
[33] Singh, H. &Waungana, A. (2001). Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. International Dairy Journal, 11, 543–551.
[34] Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D. &Reinheimer, J.A. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobioticmicroflora in Argentinian fresco cheese. Journal of Dairy Science, 83(9), 1905-1911.
[35] Gomes, A.M. P. &Malcata, F.X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food Science and Technology, 10, 139-157.
[36] Buriti, F.C.A., Okazaki, T.Y., Alegro, J.H.A. &Saad S.M.I. (2007). Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Mina's fresh cheese in comparison with the traditional products. Archivos Latino Americanos De Nutricion 57(2), 179-185.
[37] Boylston, T.D., Vinderola, C.G., Ghoddusi, H.B. &Reinheimer, J.A. (2004). Incorporation of *Bifidobacteria* into cheeses: challenges and rewards. International Dairy Journal 14, 375-387.

# Investigating the viability of free and encapsulated forms of *L. acidophilus* and *L. casei* in probiotic quark cheese and comparing their effect on chemical and sensorial properties of cheese during storage

**Soltanzadeh, M.[1], Peighambardoust, S.H. [2*], Hesari, J. [2]**

1. MSc graduated, Department of Food Science, College of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz
2. Professor of Food Technology, Department of Food Science, College of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz

**(Received: 2019/04/11 Accepted:2019/06/05)**

The aim of this study was to investigate the viability of free and encapsulated forms of *L. acidophilus*(LA) and *L. casei*(LC) in probiotic quark cheese and comparing their effect on chemical and sensorial properties of the obtained cheese during 21 days of storage. Results showed that pH values and titratable acidity of all samples decreased and increased, respectively upon storage time. The decrease of pH was more enhanced in the LC-free samples compared to those of LA-free and capsulated forms of both bacteria, and control sample. Titratable acidity changes in cheese samples was similar to pH change. There was a significant increase in soluble nitrogen of LC-free sample upon storage time. However, this increase was not significant for control, LA-free, LA-cap and LC-cap samples. Free fatty acid content (lipolysis index) of all samples were the same in the first week. It was increased for control, LC-cap, LA-cap compared to those of LC-free and LA-free after 14$^{th}$ day of storage. For all samples increasing storage time led to significant decrease in all sensory properties except for surface color and appearance. Between probiotic strains, LC-free provided higher scores for flavor and overall acceptability attributes during 2$^{nd}$ week of storage. Increasing storage time up to 14 days did not significantly ($p<0.05$) decrease the number of free forms of lactobacilli. However, after 14$^{th}$ day, the number of free forms of bacteria were declined. Nevertheless, the viability of capsulated forms was preserved upon all storage days.

**Keywords**: Soft cheese, Characteristics, Quality, Probiotic bacteria, Encapsulation.

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