# بررسی تغییرات اسیدهای آلی در طول دوره رسیدن پنیرهای سفید آب‌نمکی ایرانی با استفاده از مایه‌های مختلف لاکتیکی

شهرام دخانی[۱]، رویا ستاری[۱] و محمدباقر حبیبی[۲]

## چکیده

*در تهیه پنیر سفید آب‌نمکی ایرانی از مایه‌های مختلف لاکتیک استفاده می‌گردد، که هر کدام آثار متفاوتی بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ارگانولپتیک پنیر می‌گذارند. بررسی این ویژگی‌ها، مخصوصاً تعیین دقیق اسیدهای آلی، برای تخمین میزان فعالیت این مایه‌ها، به دلایل مختلف حایز اهمیت است. در این پژوهش پنج نمونهٔ مختلف پنیر با پنج فرمول مختلف از مایه‌های لاکتیک تهیه گردید، و به مدت دو ماه در آب نمک هشت درصد در دمای ۱۱-۱۳ درجه سانتی‌گراد پرورانده شد. اسیدهای آلی تولید شده در نمونه‌های مختلف پنیر با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد، با استفاده از ستون مخصوص اسیدهای آلی SCR-101H، در طول موج ۲۱٤ نانومتر با شناساگر ماورای بنفش، و در مقایسه با استانداردهای خالص مربوطه با تعیین میزان بازیابی آنها انجام گردید. اسیدهای آلی پیرویک، اوروتیک، سیتریک، پروپیونیک، لاکتیک، بوتیریک و استیک در هفت مقطع زمانی ۲٤ ساعت پس از تولید، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤۰، ۵۰ و ٦۰ روز پس از تولید در نمونه‌های مختلف پنیر اندازه‌گیری شد.*

*این بررسی نشان داد که هر اسید آلی تغییرات مشخصی را در طول دوره رسیدگی پنیرهای مختلف ارائه می‌کند. در کلیه نمونه‌ها، اسید لاکتیک به عنوان اسید غالب در نمونه‌ها تعیین گردید. مقدار کل اسیدهای آلی تا روز سی‌ام افزایش چشم‌گیری داشت، و سپس تا پایان دوره نگهداری کاهش یافت. با توجه به این‌که اسید لاکتیک ۸۰-۹۰ درصد از کل اسیدهای آلی را به خود اختصاص داد، این روند عمدتاً تحت تأثیر تغییرات اسید آلی مذکور بود. روند تغییرات اسیدهای آلی در کلیه نمونه‌ها تقریباً مشابه بود، ولی مقدار متفاوتی را نشان دادند. پنیر شامل مایه مزوفیل آروماتیک با کد CH-N-01 (شامل لاکتوکوکوس‌های لاکتیک و لوکونوستوک) و لاکتوباسیلوس کازیی، و پنیر شامل مایه مزوفیل آروماتیک و ترموفیل با کد CH-1 (مخلوط برابر از لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس سالیواریوس زیر گونه ترموفیلوس) کاهش زیادی در مقدار اسید سیتریک و افزایش بسیاری در مقدار اسید استیک و پروپیونیک، در مقایسه با نمونه‌های دیگر پنیر نشان دادند (P<۰/۰۱). در حالی‌که، در پنیر شامل مایه ترموفیل CH-1 و پنیر شامل مخلوط مایه ترموفیل CH-1 و مزوفیل با کد 54 (کشت O) افزایش چشم‌گیری در مقدار اسید بوتیریک، در مقایسه با سایر نمونه‌های پنیر مشاهده گردید. در کلیه نمونه‌های پنیر روند تغییرات اسید پیرویک نامنظم بود. با تجزیه و تحلیل رگرسیون چند مرحله‌ای، زمان رسیدن نمونه‌های مختلف پنیر با توجه به مقدار اسیدهای آلی موجود در آنها نیز تعیین گردید.*

**واژه‌های کلیدی:** *مایه‌های لاکتیک، اسیدهای آلی، پنیر سفید آب‌نمکی*

---

۱. به ترتیب استاد و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. استادیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.9.1 ]

## مقدمه

رسیدن پنیر مستلزم تغییرات فیزیکی، شیمیایی و میکروبی است، که در ترکیب اصلی پنیر تأثیر می‌گذارد (۲۱).

گردآوری اطلاعات در بارهٔ تولید و تغییرات اسیدهای آلی در پنیرهای تخمیری مهم است، زیرا متابولیسم ترکیبات موجود در شیر و کیفیت این محصولات مشخص می‌گردد. حضور اسیدهای آلی در شیر و فراورده‌های لبنی ممکن است به دلیل هیدرولیز چربی شیر(اسیدهای چرب)، افزودن مستقیم اسید به این فراورده‌ها (نظیر اسیدهای سیتریک، هیپوریک، اوریک، اوروتیک و اسکوربیک)، یا در اثر رشد باکتریایی(نظیر اسیدهای پیرویک، لاکتیک، استیک و پروپیونیک) باشد. تعیین کمّی اسیدهای آلی به خاطر شرکت در طعم بیشتر پنیرهای رسیده، و نیز به دلایل تغذیه‌ای، و به عنوان یک شناساگر در تعیین فعالیت باکتری‌های مایه و غیر مایه حایز اهمیت است. این اسیدها هم‌چنین می‌توانند در نگهداری غذا بسیار مهم باشند (٦، ۷، ۱۱ و ۲۳).

در پنیر آنزیم‌های فعال میکروبی همراه با متابولیت‌های آنها حضور دارند، و بهترین ترکیباتی هستند که میزان فعالیت گلیکولیز، لیپولیز و پروتئولیز را در پنیر رسیده مشخص می‌کنند. برابر پژوهش‌های انجام شده، بهترین ترکیباتی که میزان فعالیت گلیکولیز را در پنیر چدار نشان می‌دهند اسیدهای آلی پروپیونیک و استیک هستند، و بهترین ترکیبات در بررسی میزان فعالیت لیپولیز، اسیدهای چرب فرار $C_{10}$، $C_{12}$، $C_{14}$ و $C_{16}$ می‌باشند، و برای بررسی میزان فعالیت پروتئولیز، تعیین اسیدهای آمینه آزاد همچون لوسین، متیونین و گلوتامیک اسید مهم می‌باشد (۲۲).

فرایند رسیدن در پنیر، به دلیل طبیعت ناهمگن آن، کاملاً شناخته شده نیست. تغییراتی که در طول رسیدن پنیر رخ می‌دهد بستگی به شرایط شیمیایی لخته پنیر، مانند فعالیت آبی(Water activity)، pH ، پتانسیل اکسیداسیون و احیا، مواد معدنی، و چندین فاکتور دیگر همچون درجه حرارت رسیدن، مقدار و روش نمک‌زنی و طبیعت میکروفلورای ثانویه دارد (۲۱).

پدیدهٔ اصلی در تولید پنیر، تولید اسید لاکتیک توسط باکتری‌های مایه لاکتیکی می‌باشد. کربوهیدرات موجود در شیر از طریق مسیر شناخته شده هگزوز دی‌فسفات به اسید پیرویک تبدیل می‌شود. اسید پیرویک به عنوان گیرندهٔ الکترون عمل کرده، تبدیل به اسید لاکتیک می‌شود (۳). اسید پیرویک یک ترکیب واسطه است، و می‌تواند به ترکیبات دیگر بدل شود. در پنیرهای رسیده تخمیر لاکتوز کمتر مورد نظر است، ولی اثرهای مهمی بر پدیدهٔ رسیدن می‌گذارد (٤).

در بررسی کمی و کیفی اسیدهای آلی موجود در فراورده‌های لبنی، مناسب‌ترین و سریع‌ترین روش استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد (High Performance Liquid Chromatography) است (۱۱، ۲۲ و ۲۳).

هدف از این پژوهش تعیین کمی و کیفی چند نوع اسید آلی و بررسی روند تغییرات آنها در طول دوره رسیدن پنج نمونه مختلف پنیر سفید ایرانی تهیه شده با پنج فرمول مختلف مایه‌های لاکتیک می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### مواد

۱. شیر خام با ۳/۳ درصد چربی از محل دامداری دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، واقع در مزرعه لورک تهیه گردید.

۲. انواع مایه‌های لاکتیک استفاده شده در این طرح عبارتند از :

الف) ترموفیل با کد CH-1، مخلوط لاکتوباسیلوس بولگاریکوس(*Lactobacillus bulgaricus*) و استرپتوکوکوس سالیواریوس زیرگونه ترموفیلوس(*Streptococcus salivarius* spp *thermophilus*) به نسبت یک به یک.

ب) مزوفیل با کد 54، مخلوط لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس (*Lactococcus lactis* spp. *lactis*) با نسبت ۲-۵ درصد، و لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه کرموریس (*Lactococcus lactis* spp. *cremotis*) با نسبت ۹۵-۹۸ درصد.



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.9.1 ]

ج) مزوفیل آروماتیک با کد CH-N-01 ،مخلوط لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه‌های لاکتیس و کرموریس و بیوواریتهٔ دی‌استی لاکتیس(*Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis*) و لوکونوستوک مزنتروییدس زیرگونهٔ کرموریس (*Leuconostoc mesentroides* sp. *cremoris*) به ترتیب با نسبت ۱-۵ درصد، ۷۰-۸۰ درصد، ۱۰-۲۰ درصد و ۵-۱۵ درصد، که به صورت پودرهای خشک تصعیدی درای واک در بسته‌های دو گرمی از کمپانی کریستین هانسن دانمارک تهیه گردید.

۳. آنزیم لخته کنندهٔ شیر با نام تجارتی هانیلاز، در بسته‌های ۱۰۰ گرمی از کمپانی هانسن دانمارک تهیه شد.

٤. به منظور تجزیه نمونه‌ها، کلیه مواد شیمیایی این طرح از کمپانی‌های مرک آلمان یا زیگمای انگلیس(با خلوص بالاتر از ۹۹/۵ درصد) تهیه گردید.

## لوازم

### سیستم HPLC

برای اندازه‌گیری اسیدهای آلی از دستگاه HPLC، مدل شیمادزو LC-6A استفاده گردید. این سیستم مجهز به شناساگر ماورای بنفش مدل شیمادزو SPD-6AV، آون ستون مدل CTO-6A، سیستم کنترل کننده مدل SCL-6A و کروماتوپک تجزیه و تحلیل کننده کامپیوتری مدل C-R4A بود. از یک ستون جدا کنندهٔ غربالی یونی(Ion Exclusion) شیمادزو مدل SCR-101H به ابعاد ۷/۹ × ۳۰۰ میلی‌متر، در داخل آون با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد استفاده، و هر نمونه به یک Injection port از نوع Rheodyne تزریق گردید. شناساگر ماورای بنفش روی ۲۱٤ نانومترتنظیم شد. سیستم فاز متحرک، ایزوکراتیک وبرای تهیه فاز متحرک از محلول اسید سولفوریک رقیق با نرمالیته ۰/۰۰۹ استفاده گردید. محلول مذکور از صافی‌های تحت خلأ ۰/٤۵ میکرون عبور داده شد و آن گاه عمل هواگیری تحت خلأ به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت(۱۱).

سرعت حرکت فاز متحرک روی ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه، حساسیت سیستم روی چهار، و سرعت چارت روی پنج میلی‌متر در دقیقه تنظیم گردید. برای محاسبه درصد بازیابی اسیدهای آلی روش دخانی(۱۱) به کار رفت.

## روش‌ها

### تهیه کشت‌های لاکتیک

به ۵۰۰ میلی‌لیتر شیر تازه کم‌چربی، که در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل و خنک شده بود، حدود یک گرم از باکتری‌های مایه مورد نظر افزوده گردید، و در انکوباتور در شرایط زیر نگهداری شد و پس از تولید ۰/۷ تا ۰/۸۵ درصد اسید لاکتیک به یخچال منتقل گردید(۱).

الف) مزوفیل آروماتیک با کد CH-N-01 در دمای ۲۰-۲۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱٦-۲۰ ساعت

ب) ترموفیل با کد CH-1 در دمای ٤۰-٤٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵-۷ ساعت

ج) مزوفیل با کد 54 در دمای ۲۰-۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱٤-۱۸ ساعت

د) لاکتوباسیلوس کازیی با کد 01 در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤-٤۸ ساعت

کشت‌های مذکور در پنج فرمول متفاوت در تهیه پنج نمونهٔ مختلف پنیر به کار رفت.

این فرمول‌ها عبارتنداز :

۱. فرمول اول شامل ۰/۵ درصد مزوفیل آروماتیک CH-N-01 و ۰/۵ درصد لاکتوباسیلوس کازیی 01

۲. فرمول دوم شامل ۰/۵ درصد مزوفیل آروماتیک CH-N-01 و ۰/۵ درصد ترموفیل CH-1

۳. فرمول سوم شامل یک درصد ترموفیل CH-1

٤. فرمول چهارم شامل ۰/۵ درصد مزوفیل 54 و ۰/۵ درصد ترموفیل CH-1

۵. فرمول پنجم شامل یک درصد مزوفیل 54

### مراحل تولید پنیر

تولید پنیر از شیر گاو در کارگاه آزمایشی گروه علوم و صنایع



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.9.1 ]

غذایی دانشگاه صنعتی اصفهان، برابر دستور زیر انجام گرفت (۱):

شیر خام پرچربی، پس از انجام آزمایش‌های کنترل کیفیت شیر، صاف شد، و سپس چربی آن تا میزان سه درصد با خامه‌گیر مدل Westfalia استاندارد گردید. شیر مذکور در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه پاستوریزه شد. کشت‌های لاکتیک به مقدار یک درصد به شیر ۳۵ درجه سانتی‌گراد اضافه گردید. پس از افزایش اسیدیته شیر به میزان دو درجه دورنیک، کلرورکلسیم به میزان ۰/۰۲ درصد و هانیلاز قارچی به مقدار یک گرم برای ۱۰۰ لیتر شیر افزوده شد. برش دلمه پس از انعقاد به صورت مکعب‌های دو سانتی‌متری صورت گرفت. پرس دلمه‌ها به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. نسبت وزن وزنه در حین پرس به لختهٔ نهایی در پایان پرس ۱/۲ بود. دلمه به قالب‌هایی با ابعاد ۶× ۸ × ۸ سانتی‌متر بریده شد، و قالب‌ها در آب نمک اشباع ۲۲ درصد با دمای ۲ ± ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج ساعت قرار گرفتند، و هر یک ساعت یک بار زیر و رو شدند. پس از خارج کردن قالب‌ها از آب نمک اشباع، به مدت دو ساعت در هوای آزاد قرار داده شدند و سپس در آب نمک هشت درصد بسته‌بندی، و در سردخانه ۱۱-۱۳ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ماه نگهداری گردیدند. نمونه‌های مختلف پنیر در فواصل زمانی ۲۴ ساعت، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ روز پس از تولید، برای تجزیه و تحلیل HPLC به کار رفتند.

### آماده‌سازی نمونه‌ها

استخراج اسیدهای آلی برابر دستورالعمل دخانی(۱۱)، با مقداری تغییر انجام گرفت. قالب‌های پنیر پس از خروج از سردخانه در داخل هاون به صورت مخلوط یک‌نواخت درآمد. ۲۰ گرم از نمونهٔ یک‌نواخت شده توزین شد و به یک بالن ژوژهٔ ۲۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس به وسیله محلول بافر به حجم رسانیده شد (محلول بافر مخلوطی از ۵۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۰۰۹ نرمال، ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و پنج میلی‌لیتر محلول EDTA پنج درصد بود). آن گاه این محلول رقیق شده با سانتریفوژ مدل EBA-3 Hettich در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید، و سپس از صافی میلی‌پور ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. ده میکرولیتر از هر نمونه با سه تکرار به دستگاه HPLC تزریق گردید، و نتایج به دست آمده و اطلاعات مربوط به سطح زیر منحنی‌های نمونه‌ها و زمان پایداری(Retention time) هر منحنی ثبت شد. نوع و غلظت اسیدهای آلی موجود در نمونه، با توجه به منحنی‌های استاندارد و زمان پایداری هر اسید خالص، مشخص و محاسبه گردید(۱۱).

### میزان رطوبت

نمونه‌ها در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در آون، تا رسیدن به وزن ثابت خشک شدند(۵).

### اندازه‌گیری میزان نمک در پنیر

برای تعیین میزان نمک از روش ول‌هارد(Volhard) استفاده، و به صورت درصد نمک در نمونه مرطوب پنیر گزارش گردید(۵).

### تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش، عوامل مؤثر بر فرایند، که به صورت متغیر تأثیر داشتند، شامل نوع مایه‌های مورد استفاده در تولید پنیر(پنج فرمول مختلف) و زمان نگهداری (هفت فاصله زمانی مختلف) بودند، که مورد بررسی قرار گرفتند. هر آزمایش با سه تکرار انجام شد. در تمام آزمون‌ها از تجزیه واریانس و اثر متقابل میانگین‌ها استفاده شد. طرح آماری به صورت طرح فاکتوریل در چارچوب طرح کاملاً تصادفی بود، واز نرم‌افزار SAS برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده گردید. برای مقایسه میانگین‌های برخی از صفات تحت بررسی از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل چند مرحله‌ای رگرسیون با نرم‌افزار SAS



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.9.1 ]

انجام شد. این برنامه پی در پی یک متغیر را به یک مدل خطی اولیه اضافه یا حذف می‌کند، و معنی‌دار بودن یا نبودن متغیر مربوطه را مشخص می‌نماید (P<۰/۰۵). با تجزیه و تحلیل رگرسیون، میزان تأثیر مایه‌ها بر زمان رسیدن پنیر مشخص گردید.

## نتایج و بحث

همان‌گونه که در شکل ۱ مشخص است، میزان رطوبت در کلیه نمونه‌ها حدود ۵-۷ درصد افزایش نشان داده است. رطوبت اولیه در ۲٤ ساعت پس از تولید، مربوط به قرار دادن نمونه‌های مختلف پنیر در آب نمک می‌باشد. پس از ۱۰ روز، میزان رطوبت افزایش چشم‌گیری نشان می‌دهد. در هر نوبت آزمایش، میان نمونه‌های مختلف پنیر اختلاف معنی‌داری دیده می‌شود(P< ۰/۰۱). افزون بر درجه حرارت نگهداری پنیر (۱۳-۱۱ درجه سانتی‌گراد)، یکی از عوامل اصلی افزایش رطوبت، غلظت کم آب نمک(۸٪) پنیرهای بسته‌بندی شده است. به دلیل کمی غلظت آب نمک، در حین نگهداری لخته و رسیدن، آب‌گیری ادامه یافته و عامل اصلی تغیرات رطوبت لخته می‌باشد. پژوهشگران دیگر در پنیرهای آب‌نمکی به نتایج مشابهی رسیده‌اند (۱۸ و ۲۹).

جدول ۱ درصد نمک در نمونه مرطوب پنیر را نشان می‌دهد. چنان که دیده می‌شود، در طول دوره رسیدن، افزایش وجود دارد، که این افزایش در سطح یک درصد معنی‌دار است(P< ۰/۰۱).

شکل ۳ یک کروماتوگرام از اسیدهای آلی موجود در یک نمونه پنیر(فرمول چهارم) را در روز سی‌ام از رسیدگی نشان می‌دهد. نوع اسیدهای آلی نمونه مذکور با توجه به زمان پایداری اسیدهای آلی استاندارد موجود در کروماتوگرام شکل ۲ شناسایی شد، و با توجه به درصد بازیابی هر کدام از اسیدهای آلی استاندارد، میزان هر اسید آلی بر حسب میکروگرم در گرم ماده خشک محاسبه گردید (۱۱).

جدول ۲ درصد بازیافت اسیدهای آلی را در نمونهٔ پنیر برابر دستورالعمل دخانی (۱۱) نشان می‌دهد. همان گونه که در جدول ۱ دیده می‌شود، درصد بازیابی اسیدهای فوق بالاتر از ۹۸ درصد می‌باشد، که مشابه روندی است که در گزارش دخانی (۱۱) نشان داده شده است.

شکل ٤ مقدار کل اسیدهای آلی را در مراحل مختلف رسیدگی نشان می‌دهد. این شکل در غالب نمونه‌ها تا روز سی‌ام افزایش، و سپس تا پایان دوره رسیدگی کاهش نشان می‌دهد. غلظت اسید لاکتیک در اکثر نمونه‌ها ۸۰ تا ۹۰ درصد از کل غلظت اسیدهای آلی است. افزایش اسید لاکتیک، به ویژه در مراحل اولیه رسیدگی، از اهداف استفاده از مایه‌های لاکتیکِ می‌باشد. افزون بر این، اسید لاکتیک می‌تواند به عنوان یک ترکیب بازدارنده آلوده کننده‌های میکروبی مانند کلی فرم‌ها عمل کند (۲٦).

همان‌طور که در شکل ۵-a دیده می‌شود، اسید لاکتیک تا روز چهلم نگهداری در کلیه نمونه‌ها افزایش، و سپس تا پایان رسیدگی کاهش نشان داده است. افزایش اسید لاکتیک تا روز چهلم نشان دهندهٔ تداوم فعالیت‌های باکتری‌های لاکتیک است، و این امر ثابت می‌کند که غلظت نمک در لخته به حدی نرسیده است که فعالیت اسیدسازی آنها را مختل کند. تغییرات این اسید در مراحل ابتدای نگهداری پنیر در نمونه‌های ۲، ۳ و ٤ شدیدتر از ۱ و ۵ می‌باشد، در حالی که در مراحل بعدی نگهداری کاهش بیشتر این اسید مربوط به تأثیر مایه‌های لاکتیکی ۱ و ۵ است، که دلیل آن مربوط به درجه حرارت مورد نظر در مراحل تهیه و نگهداری پنیر می‌باشد، که در نتیجه، بر فعالیت باکتری‌های ترموفیل و مزوفیل موجود در نمونه‌ها تأثیر می‌گذارد. کاهش میزان اسید لاکتیک از اواسط دوره نگهداری تا پایان آن، دلایل چندی می‌تواند داشته باشد. یکی از این دلایل مصرف کامل قند لاکتوز، و هم‌چنین قندهای گلوکز و گالاکتوز حاصل از تجزیه آن است. دلیل دوم می‌تواند عدم مصرف کامل قند لاکتوز، به علت نامناسب شدن شرایط برای متابولیسم لاکتوز باشد (۱۰).

برابر پژوهش انجام شده (۲۸)، تخمیر لاکتوز باقی‌مانده در



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.9.1 ]

جدول ۱. درصد نمک در نمونهٔ مرطوب پنیر در پنج فرمول پنیر تهیه شده با مایه‌های مختلف لاکتیکی در طی ۶۰ روز رسیدن

| | درصد نمک در نمونهٔ مرطوب پنیر | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ |
| لخته[1] | ۴/۸۳[a] | ۴/۰۴[c] | ۳/۶۷[d] | ۳/۶۵[d] | ۴/۲۳[b] |
| ۱۰ | ۵/۰۱[b] | ۵/۰۳[b] | ۳/۹۴[d] | ۴/۲۶[c] | ۵/۴[a] |
| ۳۰ | ۶/۱۵[a] | ۵/۴۶[c] | ۵/۳۵[d] | ۵/۳۳[d] | ۶/۰۸[b] |
| ۶۰ | ۶/۲۵[d] | ۶/۳۳[c] | ۶/۱۴[e] | ۶/۶[a] | ۶/۴۳[b] |

۱. قبل از ورود به آب نمک

میانگین‌هایی که دارای حروف غیرمشابه در یک ستون هستند اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ دارند.

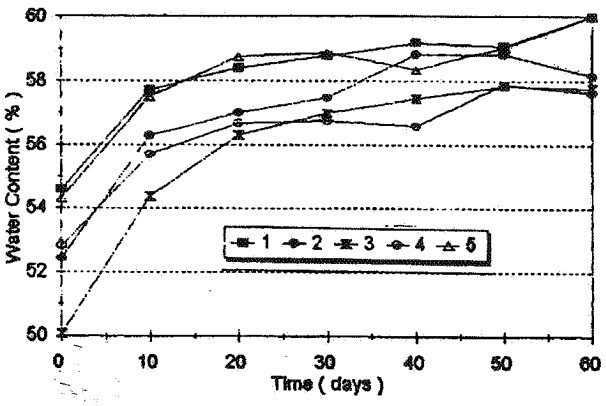
جدول ۲. درصد بازیافت اسیدهای آلی در نمونهٔ پنیر تهیه شده با دستگاه HPLC[1]

| نوع اسید آلی | A | B | C | D |
|---|---|---|---|---|
| اسید لاکتیک | ۱۰۰۰۰ | ۶۸۰۰ | ۱۶۶۱۵/۲ | ۹۸/۱ |
| اسید استیک | ۱۰۰۰ | ۱۴۵ | ۱۲۲۵/۱۵ | ۱۰۸ |
| اسید پروپیونیک | ۱۰۰۰ | ۲۷۳ | ۱۲۹۸/۴۶ | ۱۰۲/۵ |
| اسید پیرویک | ۵۰۰ | ۷۱ | ۵۷۸ | ۱۰۱/۴ |
| اسید بوتیریک | ۱۰۰۰ | ۲۶۹ | ۱۲۵۱ | ۹۸/۲ |
| اسید سیتریک | ۱۰۰۰ | ۷۸۰ | ۱۸۳۰ | ۱۰۵ |
| اسید اوروتیک | ۵۰۰ | ۲۴ | ۵۳۹ | ۱۰۳ |

۱. میانگین سه تزریق برای هر نمونه

A = میکروگرم اسید اضافه شده به یک گرم پنیر  B = میکروگرم اسید موجود در یک گرم پنیر  C = کل میزان اسید اندازه‌گیری شده

D = درصد بازیافت




شکل ۱. درصد رطوبت نمونه‌های مختلف پنیر در طول ۶۰ روز نگهداری

پنیر بستگی به میزان نمک در دلمه مرطوب دارد. افزایش غلظت نمک در پنیر، شرایط را برای فعالیت باکتری‌های مایه نامناسب می‌کند.

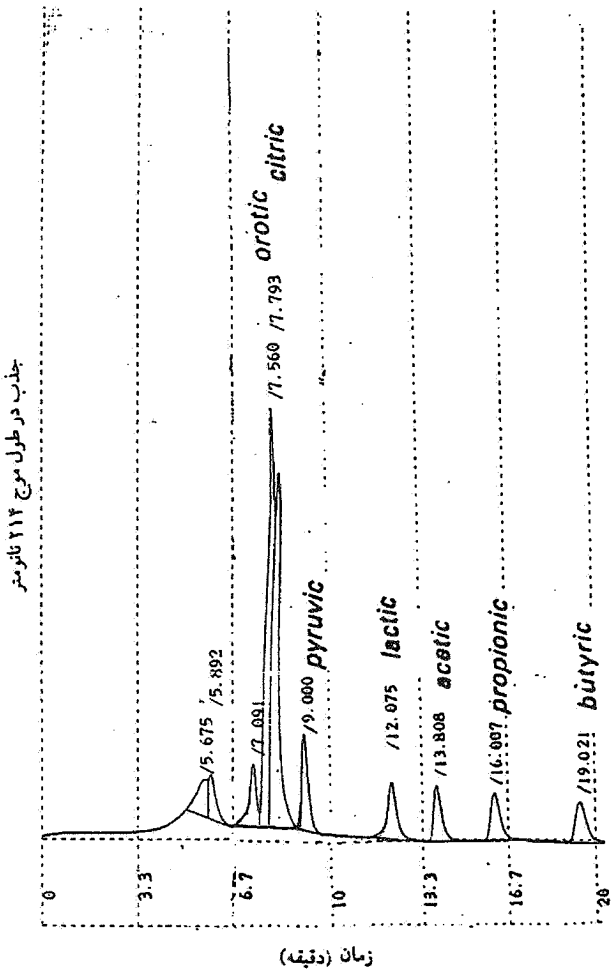
در کلیه نمونه‌ها، اسیدهای آلی بوتیریک، استیک و پروپیونیک در طول دوره نگهداری افزایش نشان می‌دهد، که البته میزان این افزایش در نمونه‌های مختلف متفاوت است (شکل۶-a ، b و c). اسید سیتریک و اسید اوروتیک در کلیه نمونه‌های پنیر روند کاهشی نشان دادند (شکل ۵-b و c).

تغییرات اسید سیتریک در نمونه‌های شامل فرمول ۱ و ۲ شدیدتر است، که دلیل آن می‌تواند حضور باکتری‌های سیترات

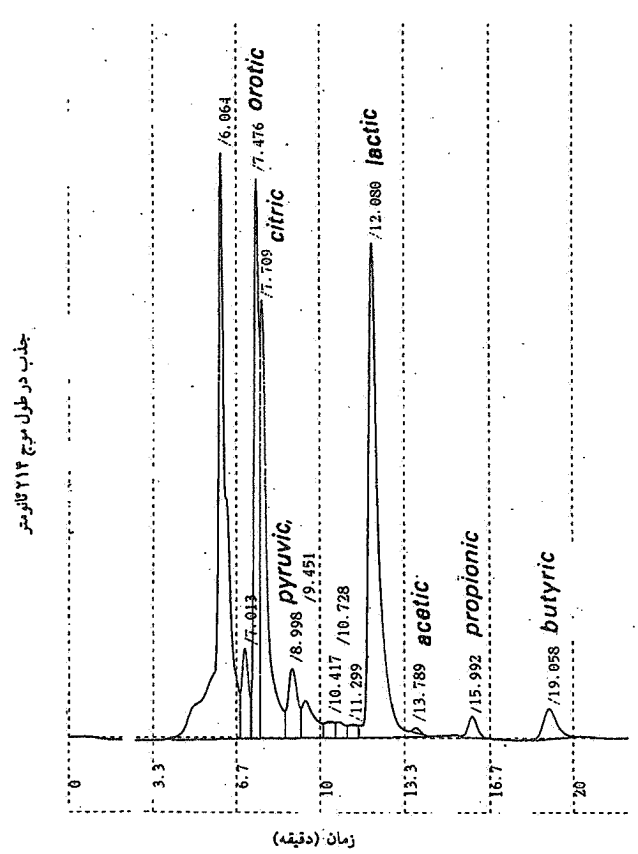


[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

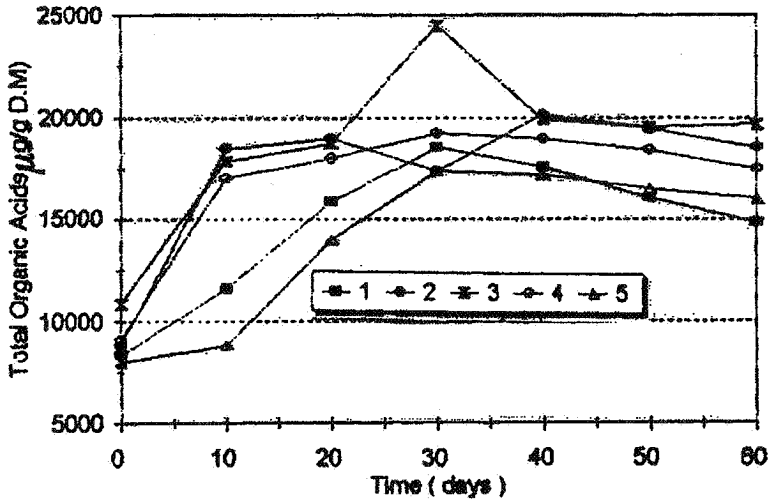
[ DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.9.1 ]




شکل ۲. کروماتوگرام HPLC اسیدهای آلی استاندارد




شکل ۳. کروماتوگرام HPLC اسیدهای آلی یک نمونه پنیر

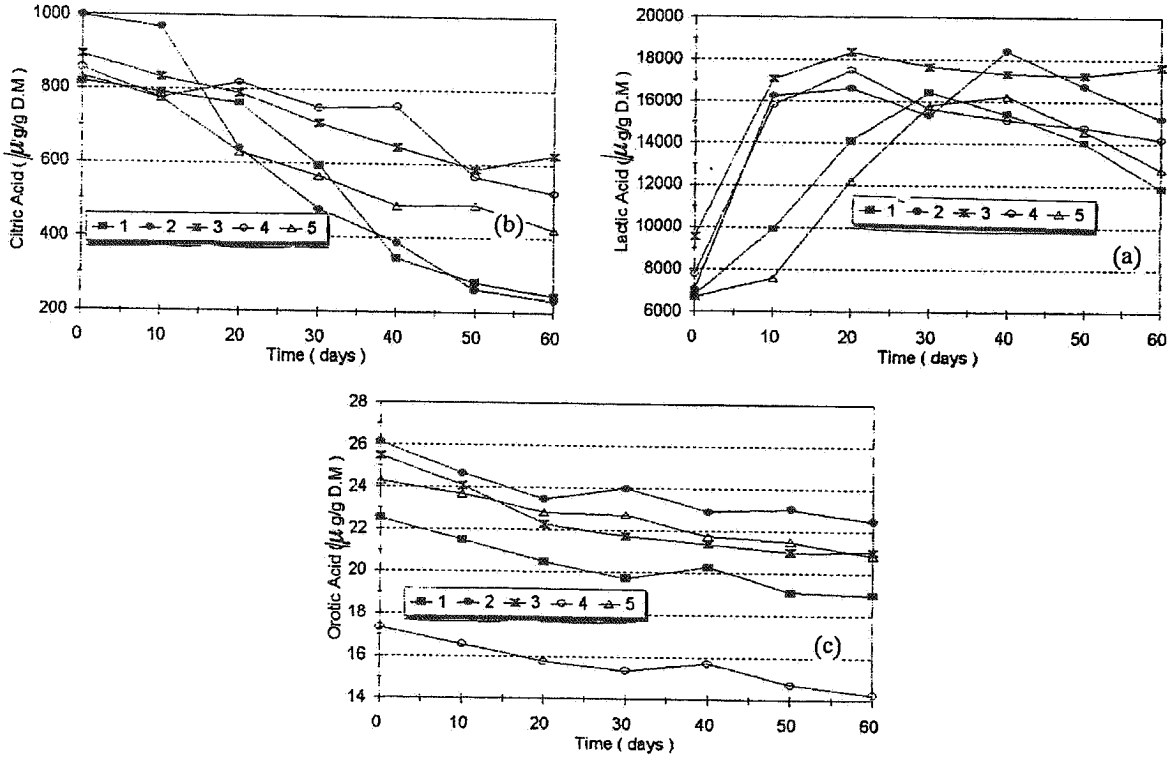



شکل ٤. تغییرات میزان کل اسیدهای آلی پنج نمونه پنیر در طی رسیدگی

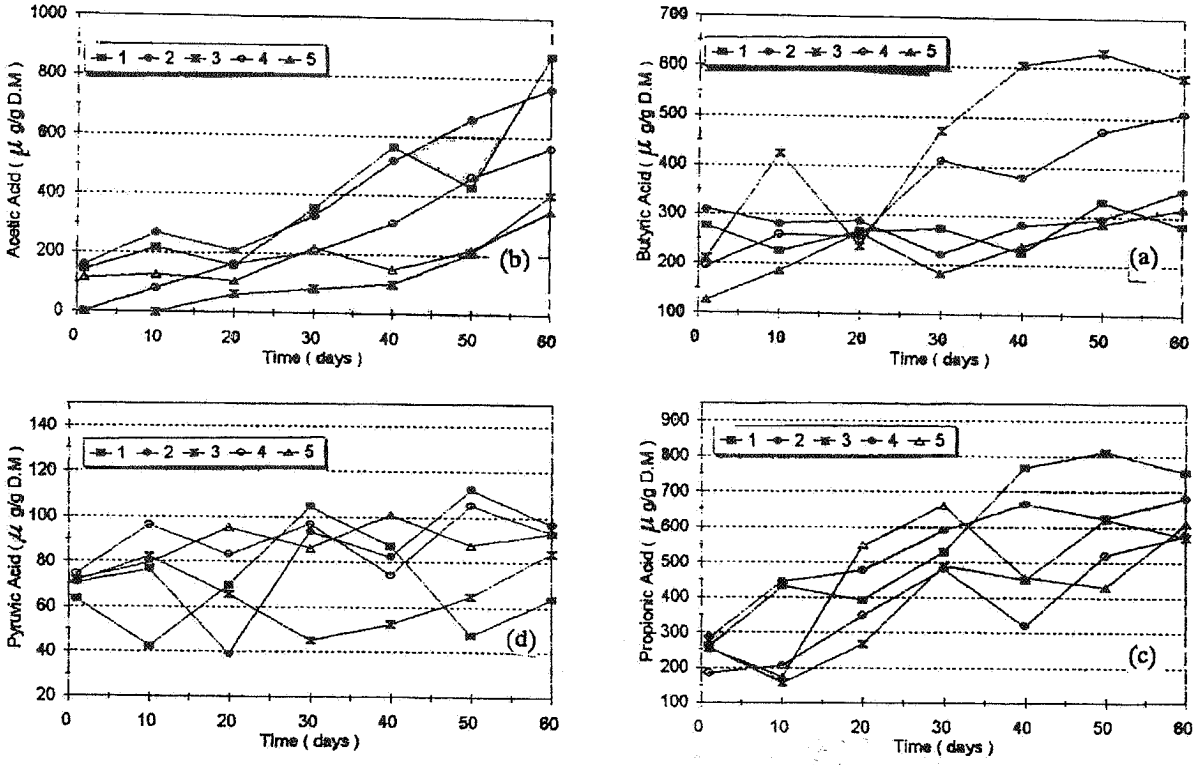


[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.9.1 ]




شکل ۵. تغییرات میزان اسید لاکتیک (a)، اسید سیتریک (b) و اسید اوروتیک (c) برحسب میکروگرم در گرم ماده خشک پنیر در طی نگهداری




شکل ٦. تغییرات میزان اسید بوتیریک (a)، اسید استیک (b) ، اسید پروپیونیک (c) ، و اسید پیرویک (d) برحسب میکروگرم در گرم ماده خشک پنیر در طی نگهداری



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.9.1 ]

مثبت مانند لوکونوستوک مزنتروییدس زیرگونهٔ کرموریس و لاکتوکوکوس لاکتیس بیوواریتهٔ دی‌استی لاکتیس باشد. گزارش‌ها (۱۰ و ۱٦) نشان می‌دهند که با حضور لاکتوکوکوس لاکتیس بیوواریتهٔ دی‌استی لاکتیس یا حضور این باکتری همراه با لوکونوستوک مزنتروییدس زیرگونهٔ کرموریس، پس از سه ماه مقدار سیترات پنیر چدار به صفر کاهش یافته است.

در میان دو نمونه پنیر یاد شده، کاهش مقدار اسید سیتریک در نمونهٔ ۲ بیش از نمونهٔ ۱ است، که دلیل آن احتمالاً کاهش سریع‌تر pH در نمونه ۲ می‌باشد. مصرف و کاهش اسید سیتریک در طول دوره نگهداری پنیر در تیمارهای فاقد باکتری‌های سیترات مثبت را می‌توان به باکتری‌های غیر مایه همچون لاکتوباسیل‌های مزوفیل و پدیوکوکوس‌ها نسبت داد، اگر چه در برخی پژوهش‌ها گزارش شده است که تعدادی از سویه استرپتوکوکوس ترموفیلوس قادر هستند مقادیر جزیی دی‌استیل در شیر تولیدکنند، که نشان دهندهٔ متابولیسم سیترات است (۹ و ۱۷).

سیترات ممکن است به عنوان سوبسترا نیز توسط مایه استفاده شود، و به اسید پیرویک و اسید سیتریک تبدیل گردد (۳).

دوتا وهمکاران (۱۲) گزارش کرده‌اند که کلیه سویه‌های لاکتوباسیلوس کازیی می‌توانند سیترات‌ها را مصرف کنند، ولی برخی از لاکتوباسیلوس‌های با تخمیر ناهمگن(Heterofermentative) لاکتوز، قادر به مصرف سیترات‌ها نیستند، در حالی‌که تعدادی از پژوهشگران خلاف این مسئله را عنوان کرده‌اند.

لاکتوباسیلوس‌ها در مجاورت سیترات‌ها به آرامی رشد می‌کنند، و سیترات را در مرحله لگاریتمی رشد مصرف می‌کنند، ولی مقادیر کمی اسید استیک (۱۵)، همراه با استوین (۱٤)، استیل و استالدیید (۱٦) تولید می‌نمایند.

روند تغییرات اسید اوروتیک در کلیه نمونه‌های پنیر نزولی است. این اسید به راحتی توسط باکتری‌ها مصرف می‌شود، و در مقایسه با شش اسید آلی مورد بررسی، به مقدار بسیار کمتری در پنیر موجود است. دیگر پژوهشگران (٦، ۱۱، ۱۹ و ۲۰) نیز به نتایج مشابهی رسیده‌اند.

اسید اوروتیک در داخل غدد پستانی حیوانات نشخوارکننده، طی یک متابولیسم بیوشیمیایی ویژه، ساخته می‌شود. پژوهش‌ها (۲۵) نشان می‌دهند که این اسید در کاهش کلسترول خون دخالت دارد.

اسید پیرویک به عنوان یک ترکیب واسطه در مسیرهای مختلف بیوشیمیایی تولید و مصرف می‌گردد، و مقدار آن در یک مجموعهٔ فعال متابولیک دائماً در حال تغییر است. با توجه به شکل ٦-d، نوسانات زیادی در مقدار این اسید در طول دوره نگهداری قابل مشاهده است. بیشترین نوسانات مربوط به نمونه‌های ۱ و ۲ می‌باشد. دلیل این امر، از یک سو، تولید اسید پیرویک از دو منبع قند و سیترات، و از سوی دیگر، مصرف بیشتر آن برای برقراری تعادل انرژی در سیستم مربوط است (۲۱).

افزایش اسیدهای آلی پروپیونیک و استیک، به ویژه در نمونه‌های ۱ و ۲ قابل مشاهده است. در صورت حضور پروپیونی باکتری‌ها، اسید پروپیونیک از تخمیر قند گلوکز حاصل می‌گردد (شکل ٦-b و c). با توجه به این که در نمونه‌های مختلف پنیر، این باکتری در دسته مایه‌های لاکتیکی مورد استفاده قرار نمی‌گیرد، می‌توان پذیرفت که به صورت تخمیر ثانویه از قند توسط باکتری‌های غیر مایه لاکتیک تولید می‌گردد. هیچ گزارشی مبنی بر تولید اسید پروپیونیک از لاکتوز یا سیترات توسط باکتری‌های مایه حاضر در پنیرهای فوق وجود ندارد. برخی از باکتری‌های بی‌هوازی یا بی‌هوازی اختیاری، به ویژه کلستریدیوم‌ها، میکروکوکوس‌ها و لاکتوباسیلوس کازیی قادر به تخمیر اسیدهای آمینه و تولید اسید چرب فرار هستند. به نظر می‌رسد سوبسترهٔ دیگری غیر از لاکتوز(احتمالاً اسیدهای آمینه) در تولید این اسید دخالت دارد. لاکتوکوکوس‌ها و لاکتوباسیل‌های لاکتیک می‌توانند از اسیدهای آمینه نظیر تریونین، پروپیونات تولیدکنند. بر پایه گزارش ناکایی و الیوت (۲٤)، تولید این اسید از پروتئین‌ها به وسیله



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.9.1 ]

لاکتوباسیلوس‌ها، خصوصاً گونهٔ کازیی، شدیدتر از لاکتوکوکوس‌های لاکتیک می‌باشد. این پژوهشگران دریافتند که لاکتوباسیلوس‌ها قادرند از آلانین، اسید استیک، و از تریونین، اسید پروپیونیک تولید کنند.

با توجه به توضیحات ذکر شده، افزایش بیشتر تولید اسید پروپیونیک، در نتیجه تأثیر مایه‌های موجود در فرمول‌های ۱و ۲ را می‌توان به حضور لاکتوباسیلوس کازیی و احتمالاً لاکتوکوکوس‌های لاکتیک، به ویژه بیوواریته دی‌استی لاکتیس نسبت داد، که در نمونه‌های دیگر حضور ندارند. همان گونه که در شکل ٦-b و c دیده می‌شود، میزان تولید اسید استیک و پروپیونیک، پس از دو ماه رسیدن، در نمونه‌های ۱ و ۲ (حاوی کشت‌های مزوفیل آروماتیک) بیش از دیگر نمونه‌ها است. اسید استیک از مسیرهای مختلف متابولیک تولید می‌گردد. دو منبع مهم و اصلی تشکیل این اسید، پیروات و سیترات می‌باشد. عمدتاً تنها محصول تخمیر قندها در لاکتوکوکوس(+)L- لاکتات است. ولی هنگامی که روی گالاکتوز، مالتوز یا مقادیر پایین گلوکز فعالیت می‌کنند، علاوه بر لاکتات، دیگر فراورده‌های حاصل از متابولیسم پیروات، همچون فرمات، استات و اتانل نیز تشکیل می‌گردد (۲۷).

نتیجه متابولیسم هم‌زمان سیترات و گلوکز در باکتری‌های لاکتیک سیترات مثبت، در مقایسه با متابولیسم گلوکز به تنهایی، تشکیل استات به جای اتانل و تشکیل لاکتات به مقدار بیشتر است. دلیل این امر تولید پیروات از دو منبع سیترات و گلوکز می‌باشد، که به وسیله باکتری‌های سیترات مثبت نظیر لوکونوستوک‌ها صورت می‌گیرد. به این ترتیب، تولید استات، در کشت‌های حاوی لوکونوستوک‌ها و لاکتوکوکوس‌های سیترات مثبت، بیش از لاکتوکوکوس‌های سیترات منفی است. نتایج پژوهش حاضر این موضوع را تأیید می‌کند (۱۰).

بر پایه گزارش افتیمیو(۱۳)، اسید استیک در پنیر فتا ۲۸ تا ٤۳ درصد از کل اسیدهای چرب موجود در آن را تشکیل می‌دهد.

اسید بوتیریک در ویژگی‌های طعمی پنیر نقش مهمی ایفا می‌کند. طبق پژوهش‌های انجام شده مختلف، اسید بوتیریک ۱۳-۱۹ درصد از کل اسیدهای چرب آزاد موجود در پنیر فتا را تشکیل می‌دهد. پژهشگران این مسئله را به طور عمده ناشی از عمل لیپولیز انتخابی می‌دانند (۳).

روند تغییرات اسید بوتیریک در کلیه نمونه‌های پنیر صعودی است (شکل ٦-a). همان گونه که مشاهده می‌گردد، این افزایش در نمونه‌های شامل کشت‌های ترموفیل و مخلوط مزوفیل و ترموفیل، بیش از کشت‌های مزوفیل(فرمول ۱ و ۵) می‌باشد.

برابر آزمایش‌های انجام شده به وسیله پژوهشگران مختلف، افزودن لاکتوباسیلوس بولگاریکوس به پنیر سوییسی تأثیر بسیاری بر فلور میکروبی و ویژگی‌های شیمیایی پنیر، مانند طعم و بافت می‌گذارد. تولید اسید بوتیریک بیشتر و ایجاد طعم نامطلوب و به تأخیر انداختن رشد میکروارگانیسم‌هایی که در این نوع پنیر مهم می‌باشند، تولید ترکیبات طعمی مناسب را کاهش می‌دهد (۸).

میان اسیدهای فوق، اسیدهای آلی لاکتیک، استیک، پروپیونیک و بوتیریک مستقیماً در ایجاد طعم پنیر دخالت دارند، در حالی که دیگر اسیدهای آلی مورد بررسی به عنوان ترکیب واسطه در تولید طعم شرکت می‌کنند.

با تجزیه و تحلیل رگرسیون چند مرحله‌ای نقش این اسیدهای آلی در زمان رسیدگی مشخص می‌گردد. در این بررسی از یک مدل خطی چند متغیره استفاده گردید. رابطه رگرسیون برای هر نمونه پنیر به صورت زیر می‌باشد:

نمونه ۱

$$t = ۱/۷\times۱۰-۲[C]+۱/۸\times۱۰-۳[L]+۵/٦\times۱۰-۲[A]$$
$$+۳/٤\times۱۰-۲[pr]+۰/۱٦[B]-۹/۹\times۱۰-۲[P]-۸۱/۱$$

نمونه۲

$$t = - ۲/۲\times۱۰-۲[C]+۵/٦\times۱۰-۲[A]-۳[O]+۹۲/٤٤$$

نمونه ۳

$$t = -۰/۱[C]+۷\times۱۰-٤[L]+۵/۵\times۱۰-۲\ [A]+$$
$$۱۰-۲\ [pr]+۸۰/٤٦$$



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.9.1 ]

نمونه ٤

$$t = ٣/٨\times١٠-٢[C]+٩/٥\times١٠-٢[A]+٥/٥\times١٠-٢[B]$$
$$-٧\times١٠-٢[P]-٣٥/٣٦٥$$

نمونه ٥

$$t = ٣\times١٠-٢[A]+٤/٥\times١٠-٤[L]-٢/٨\times١٠$$
$$-١[P]-١٦/٥٢[O]+٤١٥/٣٣$$

که در این معادلات :

t = زمان رسیدگی(روز)

[C] = غلظت اسید سیتریک(میکروگرم در گرم ماده خشک)

[L] = غلظت اسید لاکتیک (میکروگرم در گرم ماده خشک)

[A] = غلظت اسید استیک (میکروگرم در گرم ماده خشک)

[O] = غلظت اسید اوروتیک (میکروگرم در گرم ماده خشک)

[Pr] = غلظت اسید پروپیونیک (میکروگرم در گرم ماده خشک)

[P] = غلظت اسید پیرویک (میکروگرم در گرم ماده خشک)

[B] = غلظت اسید بوتیریک (میکروگرم در گرم ماده خشک)

نتایج پژوهش به این صورت خلاصه می‌گردد: اولاً، استفاده از روش کروماتوگرافی با کارایی زیاد به عنوان دقیق‌ترین و سریع‌ترین روش در بررسی کمی و کیفی اسیدهای آلی قابل قبول است. با استفاده از این سیستم و روش استخراج مناسب اسیدهای آلی به مدت ۳۰ دقیقه، یک کروماتوگرام کامل از اسیدهای آلی با درصدهای بازیابی بالاتر از ۹۰ درصد تهیه می‌گردد. ثانیاً، با تعیین میزان اسیدهای آلی و تغییرات آنها، می‌توان میزان فعالیت باکتری‌های مایه لاکتیکی را مشخص، و زمان رسیدن پنیر را با تعیین مقدار اسیدهای آلی موجود در آن معین نمود.

## سپاسگزاری

از دانشگاه صنعتی اصفهان و دانشگاه فردوسی مشهد که هزینه‌های انجام این طرح را تأمین کرده‌اند، و از پرسنل آزمایشگاه‌های دو دانشگاه فوق به خاطر همکاری‌های ارزنده در انجام این طرح سپاسگزاری می‌شود. هم‌چنین، از خانم شهناز نیازی به خاطر تایپ مقاله تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع مورد استفاده


۱. دخانی، ش. ۱۳۷۲. مطالعه در فرایند و برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی پنیرهای سفید تخمیری ایرانی از شیر بازساخته. مجله علوم کشاورزی ایران ٢٤: ٢٧-٣٧.

2. Abdel-Salam, M. H. , E. Alichanidis and G. K. Zerfiridis. 1993. Feta cheese. PP. 316-332. *In:* P. F. Fox, (Ed.), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 2, Elsevier Applied Science, London.

3. Adda, J. , J. C. Gripon and L. Vassal. 1982. The chemistry of flavour and texture generation in cheese. Food Chem. 9: 115-129.

4. Amantea, G. F. , B. J. Skura and S. Nakai. 1986. Culture effect on ripening characteristics and rheological behavior of Chedar cheese. J. Food Sci. 51(4): 912-919.

5. AOAC. 1984. Official Methods of Analysis. 14th ed. , Association of Official Analytical Chemists.

6. Bevilaqua, A. E. and A. N. Califano. 1989. Determination of organic acids in dairy products by high performance liquid chromatography. J. Food Sci. 54(4): 1076-1079.

7. Bevilaqua, A. E. and A. N. Califano. 1992. Changes in organic acids during ripening of port salut Argentino cheese. Food Chem. 43: 345-349.

8. Biede, S. L. , G. W. Reinbold and E. G. Hammond. 1975. Influence of *Lactobacillus bulgaricus* on microbiology and chemistry of Swiss cheese. J. Daity Sci. 59(2): 855-858.

9. Bottazzi, V. and F. Dellaglio. 1967. Acetaldehyde and diacetyl production by *Streptococcus themophilus* and other lactic streptococci. J. Dairy Res. 34: 109-113.




[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.9.1 ]

10. Cogan, T. M. and C. Hill. 1993. Cheese starter cultures. PP. 193-255. *In:* P. F. Fox. (Ed.), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1, Elsevier Applied Science, London.
11. Dokhani, S. 1998. HPLC analysis of organic acids in recombined Iranian fermented white cheese. Iran Agric. Res. 17(2): 125-139.
12. Dutta, S. M. , R. K. Kuila, B. C. Arora and B. Ranganathan. 1972. Effect of incubation temperature on acid and flavor production in milk by lactic acid bacteria. J. Milk Food Technol. 35: 242-244.
13. Efthymiou, C. 1967. Major free fatty acids in feta cheese. J. Dairy Sci. 50: 20-24.
14. El-Gendy, S. M. , Y. Abdel-Galil, H. Shahim and F. Z. Hegazi. 1983. Acetoin and diacetyl production by homo-and heterofermentative lactic acid bacteria. J. Food Protect. 46: 420-425.
15. Ferrer ocando, A. , A. Granados, Y. Basanta, B. Gutierrez and L. Cabrera. 1993. Organic acids of low molecular weight produced by *Lactobacilli* and *Enterococci* isolated from Palmita type Venezuelan cheese. Food Microbiol. 10: 1-7.
16. Fryer, T. F. 1970. Utilization of citrate by *Lactobacilli* isolated from dairy products. Dairy Res. 37: 9-15.
17. Groux, M. 1973. Flavor components of yoghurt. Lait. 53: 146-147.
18. Kehagias, C. , S. Koulouris, A. Samona, S. Malliou and G. Koumoutsos. 1995. Effect of various starters on the quality of cheese in brine. Food Microbiol. 12: 413-419.
19. Larson, B.L. and H. M. Hegarty. 1979. Orotic acid in milks of various species of commercial dairy products. J. Dairy Sci. 64: 1641-1645.
20. Law, B. A. 1984. Flavor development in cheeses. PP. 187-229. *In:* F. L. Davies and B. A. Law (Eds.), Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. Elsevier Applied Science Publishers, London.
21. Lombardi, A. M. , A. E. Bevilaqua and A. N. Califano. 1994. Variation in organic acids content during ripening of Reggianito cheese in air-tight sealed bags. Food Chem. 51: 221-226.
22. Marsili, R. 1985. Monitoring chemical changes in Sheddar cheese during aging by high performance liquid chromatography and gas chromatography techniques. J. Dairy Sci. 68: 3155-3167.
23. Marsili, R. T. and H. Ostapenko. 1981. High performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products. J. Food Sci. 46(1): 52-57.
24. Nakae, T. and J. A. Elliott. 1965. Production of volatile fatty acids by some lactic acid bacteria. II: Selective formation of volatile fatty acids by degradation of amino acids. J. Dairy Sci. 48: 293-299.
25. Richardson, T. 1978. The hypocholestermic effect of milk. A review. J. Food Protect. 41: 226-235.
26. Scott, R. 1985. Cheesemaking Practice. Elsevier Applied Science Publishers, London.
27. Tamime, A. Y. 1987. Microbiology of starter cultures. PP. 113-156. *In:* R. K. Robinson (Ed.), Dairy Microbiology. Vol. 2, Applied Science Publishers, London.
28. Turner, K. W. and T. D. Thomas. 1980. Lactose fermentation in Cheddar cheese and the effect of salt. N. Z. J. Dairy Sci. Technol. 15: 265-273.
29. Tzanetakis, N. , A. Vafopoulou-Mastrojiannaki and E. Litopoulou-Tzanetaki. 1995. The quality of white-brined cheese from goat's milk made with different starters. Food Microbiol. 12: 55-63.



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.9.1 ]