مطالعه تاثیر باکتریهای لاکتیکی حرارت دیده بر روی سرعت پروتئولیز پنیر سفید آب - نمکی ایرانی

ثریا آذرنیا، محمد رضا احسانی و سید احمد میر هادی

کارشناس ارشد مؤسسه تحقیقات دامپروری ، دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی

دانشگاه تهران و محقق مؤسسه تحقیقات دامپروری کشور

تاریخ پذیرش مقاله ۷۶/۱۰/۱۷

خلاصه

در این تحقیق بمنظور دست‌یابی به زمان رسیدن کوتاهتر پنیر سفید آب - نمکی ایرانی از فرآیند شوک حرارتی میکروارگانیزمهااستفاده شد. باکتریهای لاکتیک "استرپتوکوکوس ترموفیلوس" و "لاکتوباسیلوس بلگاریکوس تحت این فرآیند قرار گرفتند. بررسی pH مطلوب فعالیت باکتریهای مزبور در طی دوره انکوباسیون نشان داد که pH مطلوب فعالیت لاکتوباسیلوس بلگاریکوس کمتر از استرپتوکوکوس ترموفیلوس می‌باشد. شمارش جمعیت باکتریهای مورد نظر در طی مدت انکوباسیون ما را به لزوم تنظیم دائمی pH بمنظور کوتاه کردن زمان تجدید نسل ، افزایش ضریب رشد و بالا بردن بهره وکارایی مایه‌کشت تولید شده هدایت نمود. نتیجه حاصل از بررسی بهترین درجه حرارت و زمان شوک حرارتی نشان داد که شرایط بهینه برای دست‌یابی به بیشترین تأخیر در تولید اسیدلاکتیک و کمترین آسیب در فعالیت پروتئولیتیکی باکتریهای مورد نظر دمای $60^{\circ}c$ و زمان ۱۰ ثانیه می‌باشد. نتایج حاصل از بررسیهای مربوط به تسریع پروتئولیز که با اندازه‌گیری ازت غیرپروتئینی ارزیابی شد نشان داد که در کاربرد مایه‌کشت استفاده از مخلوط ۲ درصد سوسپانسیون باکتزیهای حرارت دیده به همراه یک درصد مایه‌کشت فعال از همان باکتریها مفیدتر است. این بررسیها نشان داد که بعد از ۲۰ روز نگهداری پنیرها در آب نمک یازده درصد، میزان ازت غیرپروتئینی درنمونه‌ای که‌ازباکتریهای حرارت‌دیده‌درتهیه آن‌استفاده‌شده‌بااین میزان بعد از ۶۰ روز در نمونه شاهد برابری می‌کند.اندازه‌گیری تغییرات pH ومادهٔ خشک دونمونه فوق‌اختلاف‌معنی‌داری رانشان‌نداد($P>0/05$) امامقایسه ویژگیهای چشایی دو نمونه پنیر نشان داد که از این لحاظ اختلاف معنی‌داری وجود دارد.($P<0/01$)

واژه های کلیدی : پنیر آب -نمکی، رسانیدن، تسریع رسانیدن، شوک حرارتی، باکتریهای لاکتیکی و پروتئولیز

مقدمه

رسیدن پنیر پدیده بیوشیمیایی پیچیده‌ای است که اساس آن هیدرولیز آنزیمی ترکیبات اساسی لخته می‌باشد. سوبستراهای اصلی در این پدیده کازئین ، ماده چرب و بخشی از ترکیبات محلول شیر است. این تغییرات به لخته مشخصات جدیدی را میدهد و آن را که در ابتدا عطر و طعم خاصی ندارد به لخته‌ای با عطر، طعم، بافت و رنگ مشخص تبدیل می‌نماید. (۳، ۹، ۱۴، ۱۵، ۲۱، ۲۲، ۲۷ و ۲۸). فرآیند رسیدن پنیر طولانی، پیچیده و پرهزینه است (۹، ۱۴). هزینه‌های زیاد دوران رسیدن که اصطلاحاً به آن "خواب سرمایه" می‌گویند نقش بزرگی در قیمت تمام شده محصول دارا می‌باشد. در این مدت که در مورد برخی پنیرها نسبتاً طولانی است می‌بایستی شرایط ویژه‌ای را تثبیت نمود. کوتاه کردن دوره نگهداری پنیر یا تسریع رسانیدن بدون لطمه به ویژگیهای حسی آن از نظر

اقتصادی حائز اهمیت می‌باشد و با کاهش هزینه‌های انبارداری می‌تواند ارزش افزوده این محصول را زیاد کرده آن را با محصولات دیگر قابل رقابت نماید. تسریع رسانیدن پنیر[1] در افزایش تولید بخصوص در کشور ما می‌تواند مؤثر باشد. اهمیت اقتصادی کوتاه کردن زمان تبدیل لخته به پنیر توجه زیادی را بخود جلب کرده و تلاشهای زیادی نیز جهت یافتن راه‌حلهای مناسب انجام شده است (۹ ، ۱۸، ۲۵ ، ۲۶ و ۳۵). روشهای زیر برای کوتاه کردن زمان رسیدن پنیر مورد توجه بوده‌اند:

۱ـ بالا بردن درجه حرارت نگهداری در طول رسیدن (۱۱ ، ۱۸ ، ۲۵ ، ۲۶ و ۳۰).

۲ـ استفاده از مقادیر بیشتر آنزیم‌ها (۱ ، ۳ ، ۱۴ ، ۱۵ ، ۱۷ ، ۱۸ ، ۱۹ ، ۲۴ ، ۲۶ و ۳۵).

۳ـ استفاده از میکروارگانیزمها: افزایش جمعیت میکروبی، استفاده ازمهندسی‌ژنتیک،شوک حرارتی میکروارگانیزمها(۱۴،۱۸، ۳۰و ۳۱).

عملی‌ترین و ساده‌ترین راه در بین روشهای فوق افزودن سلولهای حرارت دیده به شیر پنیرسازی است (۱۸) اما بمنظور اجتناب از افزایش بیش از حد اسیدیته می‌بایستی با اعمال شوک حرارتی خاصیت اسیدسازی آنها را بشدت کند نمود (۸، ۱۶، ۱۸، ۳۰ و ۳۴). شوک حرارتی میکروارگانیزمها بدیواره سلولهای حرارت دیده آسیب رسانده و سبب افزایش لیزی سلول می‌گردد و بدین ترتیب پروتئولیز[2] و لیپولیز[3] در مقایسه با سلولهای حرارت ندیده و کامل سریع‌تر صورت می‌گیرد (۱۸، ۳۰ و ۳۴). بنابراین بهترین شیوه کاربرداین فرآینداین‌است‌که ضمن رسیدن‌به هدف قبلی حداقل صدمه‌به سیستم پروتئولیتیکی‌میکروب واردشود(۸،۱۶، ۳۰ و ۳۴).

از میان فرآورده‌های تبدیلی شیر، پنیر جایگاه ویژه‌ای را در تغذیه مردم کشور دارد. قسمت اعظم پنیر تولیدی کشور را پنیرهای آب ـ نمکی تشکیل میدهند، یعنی دوران رسیدن این پنیرها در آب ـ نمک سپری میشود که این مدت از چند هفته تا چند ماه بطول می‌انجامد. هزینه‌های بالای ناشی از نگهداری پنیر بمدت طولانی در انبارها و سردخانه‌ها که در فصول پر تولید بعلت اشباع ظرفیت آنها به دشورای انجام میشود این امر را بصورت عامل محدود کنندهٔ تولید مطرح نموده است، واقعیتی که در نهایت بصورت مانع عمده استفاده از تمامی استعدادهای تولیدی مناطق مستعد کشور جلوه‌گر میشود. این امر موجب میشود که اقتصادی بودن صنعت پنیرسازی با مشکل مواجه شده و در نتیجه یا این صنعت توسعه پیدا نکند و یا در پاره‌ای از موارد واحدهای فعال به رکود و تعطیلی کشانده شوند. بمنظور کاهش هزینه‌های دوران رسیدن پنیر بدون تنزل کیفی آن در این تحقیق کوشش شده است که با اعمال شوک حرارتی برروی باکتریهای لاکتیکی زمان رسیدن کوتاه شود.

مواد و روشها

ـ استفاده از استارترهای[4] باکتریهای اسیدلاکتیک[5]استارترهایی که‌دراین‌تحقیق مورد استفاده قرار گرفت بنامهای تجارتی زیر می‌باشد:

1- Yoghurt 709 VISBYVAC SERIE

2- G2MIXA - L VISBYVAC

استارترپودری شکل ۷۰۹ مخلوطی از دو باکتری اسیدلاکتیک ترموفیل[6] یعنی لاکتوباسیلوس بلگاریکوس[7] و استرپتوکوکوس[8] ترموفیلوس می‌باشد و استارتر G2MIXA نیز حاوی دو میکروارگانیزم[9] مزوفیل استرپتوکوکوس کرموریس[10] و استرپتوکوکوس لاکتیس[11] می‌باشد.

ـ لیوفیلیزاسیون[12]

استارتر پودری شکل ۷۰۹ با استفاده از محیط‌های کشت بیون ساده (دیفکو)[13]، کازوبراث[14] (مرک)[15] و شیرخشک باز ساخته ۱۱ درصد فعال گردید. شیر خشک بی‌چربی مورد استفاده از تولیدات شرکت سهامی صنایع شیرایران بوده است.

بعد از فعال‌سازی و تهیه کشت‌های متوالی از استارتر فوق ، میکروارگانیزمهای مورد نظر در محیط‌های کشت ژلوزخوندار[16] (مرک) و اُگون آگار[17] (BBL) تلقیح گردیدند. محیط کشت ژلوز

1- Accelerated Ripening 2- Proteolysis 3- Lipolysis 4- Starter 5- Lactic acid bacteria

6 - Thermophile 7- *Lactobacillus delbrueckii Subs P.bulgricus* 8 - *Streptococcus Salivarius Subs P.thermophilus*

9 - Mesophile 10 - *Streptococcus cremoris* 11 - *Streptococcus lactis* 12- Lyophilization 13 - Difco

14 - Caso Broth 15 - Merck 16 - Blood Agar 17 - Eugonagar

خوندار محیط پایه مغذی و تقویت کننده برای کلیه میکروارگانیزمها می‌باشد و از این محیط برای تعیین وجود یا عدم وجود همولیز[1] استفاده می‌کنند و اضافه کردن خون دفیبرینه[2] شده و تازه گوسفند مناسب‌ترین روش جهت تعیین فرمهای همولیز می‌باشد (۵ ، ٦ و ۲۹). آزمایش مطابق با دستورالعمل مرک انجام گرفت(۲۹). از کلنی‌های رشد کرده بر روی سطح محیط کشت ژلوزخوندار بروش رنگ‌آمیزی گرم لام تهیه گردید (۵ ، ٦ و ۱۰). اُگون آگار محیط تقویت کننده مناسبی برای رشد باکتریهای پرتوقع می‌باشد (۵، ٦ ، ۱۰ و ۲۹). با رشد میکروارگانیزمهای مورد نظر در محیط کشت مزبور کلنی‌های متفاوتی ایجاد شده که با توجه به شکل و ویژگی‌های ظاهری کلنی‌ها و تهیه لام از آنها باکتریهای استارتر ۷۰۹ از یکدیگر جدا شدند. باکتریهای خالص شده استارتر مزبور با استفاده از دستگاه لیوفیلیزاسیون "EDWARDS" لیوفیلیزه شدند. آمپولهای حاوی میکروارگانیزمهای لیوفیلیزه شده تحت شرایط استریل باز شده و جهت فعال‌سازی به محیط‌های کشت بیون ساده، کازوبراث و برین هرت اینفوزیون‌براث[3] (دیفکو) و شیرخشک بازساخته ۱۱ درصد تلقیح گردیدند و سپس تا ایجاد کدورت لازم در گرمخانه ۴۲°C نگهداری شدند.

- تعیین pH مطلوب فعالیت باکتریهای لاکتیک خالص شده

بمنظور تعیین pH مطلوب باکتریهای مورد نظر از شیر خشک بازساخته ۱۱ درصد استفاده شد. pH شیرخشک بازساخته ۱۱ درصد در pH های مختلف (٦/٦-٥/٦) بفواصل ۰/۲ با استفاده از هیدروکسیدسدیم و اسیدلاکتیک نرمال و استریل تنظیم گردید. لاکتوباسیلوس بلگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس خالص شده بطور جداگانه در شیرخشک‌های باز ساخته ۱۱ درصد (۱۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب) با pHهای متفاوت تلقیح گردیدند. بعد از انکوباسیون باکتریهای رشد کرده در شیر خشک‌های بازساخته بطور جداگانه در محیط کشت MRS-Agar[4](مرک) بروش pour plate کشت شده و بعد از ۴۸ ساعت تعداد کلنی‌های رشد کرده در پلیت‌ها شمارش شدند و نتایج مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت (٦ و ۱۰ و ۲۹). pH محیط‌ها با استفاده از دستگاه pH متر دیجیتال[5] مدل ٦۳۲ اندازه‌گیری شد و برای شمارش کلنی‌ها از دستگاه کلنی کانتر[6] استفاده گردید.

- افزایش تعداد باکتریهای لاکتیک در هر میلی‌لیتر از نمونه

ابتدا باکتریهای لاکتیک خالص شده لاکتوباسیلوس بلگاریگوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس سه بار متوالی در شیر خشک بازساخته ۱۱ درصد کشت شدند. بمنظور بررسی تأثیر ثابت نگهداشتن pH محیط کشت بر روی تغییرات جمعیت باکتریهای مورد نظر pH محیط کشت در طی مدت انکوباسیون بر روی pH مطلوب فعالیت لاکتوباسیلوس بلگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس تنظیم و ثابت نگاهداشته شد. در این بررسی بدو صورت زیر میکروارگانیزمهای مورد نظر در محیط کشت تلقیح گردیدند و سپس در دمای ۴۲°c نگهداری شدند و نتایج بدست آمده مورد مقایسه قرار گرفت:

۱) ۲ درصد حجمی از سوسپانسیون باکتریهای لاکتیک مورد نظر به شیر خشک بازساخته ۱۱ درصد استریل تلقیح شد و در مدت ۱۰ ساعت انکوباسیون، pH محیط کشت بفاصله یکساعت برروی pH مطلوب رشد میکروارگانیزمها تنظیم گردید.

۲) ۲ درصد حجمی از سوسپانسیون باکتریهای مورد نظر به شیر خشک بازساخته ۱۱ درصد استریل تلقیح شد و انکوباسیون ۱۰ ساعت بطول انجامید ولی در طی مدت انکوباسیون pH محیط کشت بر روی pH مطلوب رشد میکروارگانیزمها تنظیم و ثابت نگاهداشته نشد.

بعد از انکوباسیون باکتریهای رشد کرده در شیر خشک‌های بازساخته بطور جداگانه در محیط کشت MRS-Agar بروش Pour-Plate کشت شده و بعد از ۴۸ ساعت تعداد کلنی‌های رشد کرده در پلیت‌ها شمارش شدند و نتایج مورد مقایسه قرار گرفت (٦ ، ۱۰ و ۲۹).

- شوک حرارتی میکروارگانیزمها

باکتریهای لاکتیک خالص شده استارتر ۷۰۹ بطور جداگانه تحت فرآیند شوک حرارتی قرار گرفتند. جهت انجام فرآیند شوک حرارتی ابتدا به میزان ۲ درصد حجمی سوسپانسیونی از دو باکتری فوق‌الذکر بطور جداگانه به شیر خشک بازساخته ۱۱ درصد استریل تلقیح گردید. در طی مدت انکوباسیون pH محیط کشت بر روی

1 - Hemolysis
2- Defibrinated
3- Brain Heart Infusion Broth(BHI-Broth)
4 - Man, Rogosa and Sharpe Agar
5 - Digital
6- Colony Counter

pH مطلوب باکتریهای مورد نظر تنظیم و ثابت نگاهداشته شد. سوسپانسیون باکتریهایی که جمعیت آنها در هر میلی‌لیتر افزایش داده شده بود بطور جداگانه در ارلن‌مایرها توزیع گردید و سپس با استفاده از حمام آب گرم بین حرارتهای ۷۰-۵۸ °c بفواصل ۲ °c و نیز زمانهای ۳۰-۵ ثانیه بفواصل ۵ ثانیه تحت فرآیند شوک حرارتی قرار گرفتند و بلافاصله تا دمای ۳۲ °c سرد شدند.

تأثیر درجه حرارتها و زمانهای مختلف شوک حرارتی بر روی فعالیت پروتئولیتیکی و تولید اسیدلاکتیک باکتریهای حرارت دیده مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت و بهترین زمان و درجه حرارت فرآیند شوک حرارتی در جهت تأمین بیشترین تأخیر در تولید اسیدلاکتیک و کمترین آسیب بر فعالیت پروتئولیتیکی باکتریهای مورد نظر تعیین گردید.

- اندازه‌گیری فعالیت تولید اسیدلاکتیک

به منظور بررسی تأثیر درجه حرارت و زمانهای مختلف شوک حرارتی بر روی میزان تأخیر در تولید اسیدلاکتیک ، سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده (در زمانها و دماهای مختلف) و سرد شده بطور جداگانه و به میزان مساوی به شیر پنیرسازی قبل از مایه‌زنی اضافه شدند. pH گروههای مختلف پنیرهای تهیه شده اندازه‌گیری شده و نتایج بدست آمده با نمونه شاهد مقایسه گردید.

- اندازه‌گیری فعالیت پروتئولیتیکی باکتریهای حرارت دیده

جهت بررسی تأثیر درجه حرارت و زمانهای مختلف شوک حرارتی بر روی فعالیت پروتئولیتیکی باکتریهای مورد نظر سوسپانسیون باکتریهای لاکتیک حرارت دیده (در زمانها و دماهای مختلف) و سرد شده بطور جداگانه و مقدار مساوی قبل از مایه‌زنی به شیر پنیرسازی اضافه شد. فعالیت پروتئولیتیکی باکتریهای فوق‌الذکر با اندازه‌گیری ازت غیر پروتئینی پنیرهای آزمایشی و مقایسه آن با نمونه شاهد تعیین گردید. برای اندازه‌گیری ازت غیرپروتئینی از محلول تری‌کلرواستیک اسید[1] با غلظت نهایی ۱۲ درصد استفاده شد (۱۳).

- تهیه پنیر با سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده

بمنظور بررسی نقش سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده بر روی میزان پروتئولیز در پنیرهای تهیه شده بصورتهای زیر سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده و استارتر معمولی که مخلوطی از استارتر ۷۰۹ و G2Mix به مقدار مساوی بود به شیر پنیرسازی اضافه شد و نتایج بدست آمده با اندازه‌گیری ازت غیرپروتئینی نمونه‌های پنیر ۱۰ روز بعد از نگهداری در آب نمک ۱۱ درصد مورد مقایسه قرار گرفت:

۱- اضافه کردن استارتر معمولی به شیر پنیرسازی قبل از مایه‌زنی به میزان ۱ درصد حجمی صورت گرفت.

۲- افزودن سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده به شیر پنیرسازی قبل از مایه‌زنی به میزان ۲ درصد حجمی انجام شد.

۳- اضافه کردن سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده به میزان ۲ درصد حجمی همراه با استارتر معمولی بمیزان ۱ درصد حجمی عملی شد و pH محیط کشت در طی مدت انکوباسیون ثابت نگاهداشته شد.

۴- اضافه کردن سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده به میزان ۲ درصد حجمی همراه با ۱ درصد حجمی استارتر معمولی و pH محیط کشت در طی مدت انکوباسیون تنظیم نگردید.

نتایج بدست آمده از این بررسی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. جدول تجزیه واریانس با استفاده از روش آماری طرح کاملاً تصادفی تشکیل گردید و با استفاده از آزمون دانکن[2] اختلاف موجود بین میانگین تیمارها بررسی و بهترین گروه تعیین شد.

- ویژگی پنیر تهیه شده با سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده

جهت بررسی تأثیر سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده بر روی ویژگیهای پنیرهای تهیه شده دو گروه پنیر به شرح زیر تهیه گردید:

۱- افزودن استارتر معمولی به میزان یک درصد حجمی به شیر پنیرسازی قبل از مایه‌زنی (نمونه شاهد)

۲- افزودن سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده (به میزان ۲ درصد حجمی) و استارتر معمولی (به میزان یک درصد حجمی) به شیرپنیرسازی قبل از مایه‌زنی

هر دو گروه پنیر تحت شرایط یکسان در آب - نمک ۱۱ درصد و در دمای ۱۱ °C بمدت ۶۰ روز نگهداری شدند. در طی دوره رسیدن میزان پروتئولیز، ماده خشک، pH و خصوصیات چشایی، دو گروه پنیر در فواصل زمانی معین (هر ۱۰ روز یکبار) اندازه‌گیری و با یکدیگر مقایسه شد.

برای بررسی شدت پروتئولیز تغییرات ازت غیرپروتئینی در

1 - Tricholoroacetic acid

2 - Duncan Procedure

دو گروه پنیر ارزیابی شد. نتایج بدست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها با روش آماری طرح کاملاً تصادفی و آزمایش فاکتوریل انجام شد.

ماده خشک دو گروه پنیر با استفاده از دستگاه (Thermo Control Infrared Dryer, Sartorius Germany) اندازه‌گیری شد . جهت اندازه‌گیری pH نمونه‌های پنیر ابتدا نمونه‌ها براساس روش استاندارد (AFNOR-Chimie-VII-9) آماده شدند و سپس pH آنها با استفاده از دستگاه pHمتر مدل ۶۳۲ اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها با روش آماری طرح کاملاً تصادفی و آزمایش فاکتوریل انجام شد.

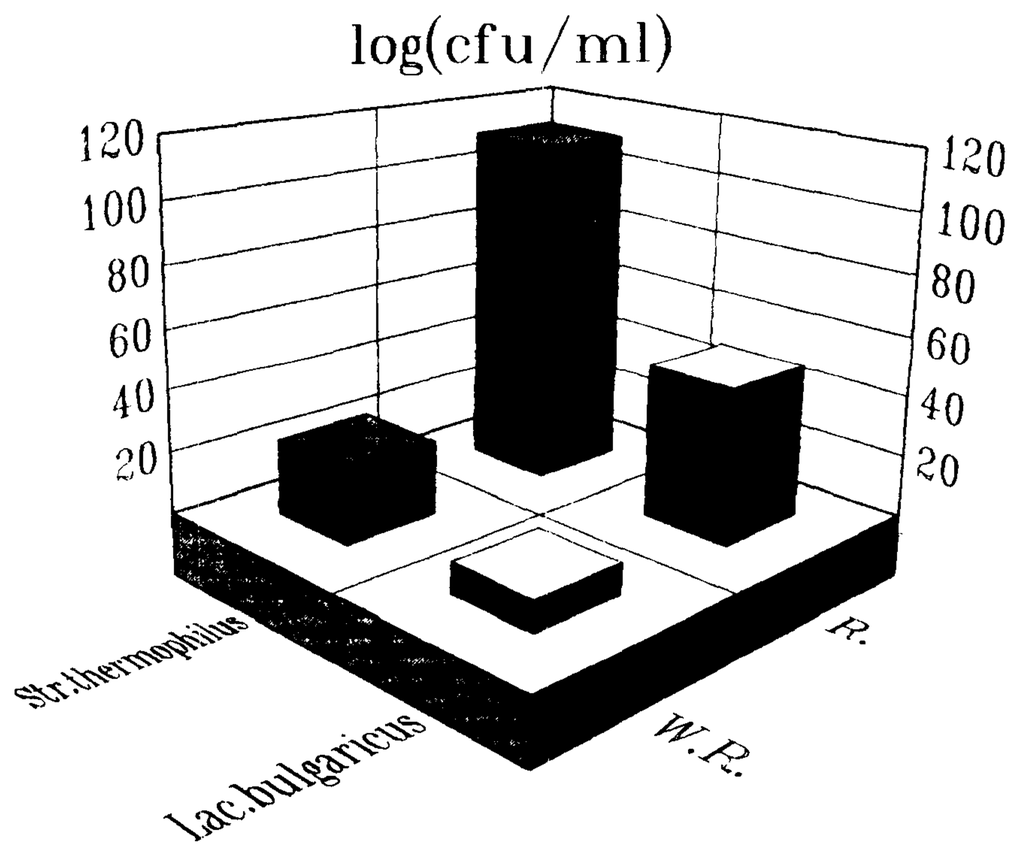
برای ارزیابی چشایی نمونه‌های پنیر از روش انگیزه واحد[1] استفاده شد (۱۲). تعداد داورها برای هر دو نمونه یکسان و ۱۰ نفر انتخاب شد. نمونه‌های هر گروه در یک روز و زمان مشخص در اختیار داوران قرار گرفت تا بدون مقایسه نظرات خود با نظر دیگران نظر نهایی خود را درباره گروههای آزمایشی مورد نظر در فرمهای مخصوص منعکس نمایند. نظرات افراد در فرمهای مخصوص با استفاده از سیستم هدونیک[2] بصورت کیفی گزارش شد و براساس همان سیستم نمره‌گذاری گردید. جدول تجزیه واریانس با استفاده از روش آماری طرح کاملاً تصادفی و آزمایش فاکتوریل تنظیم گردید.

نتایج

در مشاهده میکروسکوپی لامهای تهیه شده از باکتریهای لاکتیک موجود در استارتر ۷۰۹ میکروارگانیزمهای مزبور برنگ بنفش مشاهده شدند. هر دو باکتری در محیط کشت اُگون آگار همولیز از نوع آلفا ایجاد کردند. استرپتوکوکوس ترموفیلوس بصورت کلنی‌های ریز و خاکستری رنگ بر سطح محیط کشت رشد کرده بود و لاکتو باسیلوس بلگاریکوس بصورت کلنی‌های برجسته و خاکستری رنگ بر سطح محیط کشت مشاهده شد. در مشاهده میکروسکوپی لامهای تهیه شده از کلنی‌های فوق‌الذکر استرپتوکوکوس ترموفیلوس بصورت کوکسی‌های بهم پیوسته و برنگ بنفش مشاهده شد. بدین ترتیب باکتریهای لاکتیک موجود در استارتر ۷۰۹ خالص و از یکدیگر جدا شدند و در آزمایشات مورد نظر بطور جداگانه مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج حاصل از بررسی pH مطلوب فعالیت باکتریهای لاکتیک خالص شده نشان داد که بهترین pH برای حداکثر رشد باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس pH=۶/۲ و برای لاکتوباسیلوس بلگاریکوس pH=۶ می‌باشد. بررسیهای آماری نشان داد که یک رابطه معنی‌داری بین تغییرات pH و میزان رشد باکتریهای مورد نظر وجود دارد ($P<0/05$).

شکل ۱ نشان میدهد که تأثیر ثابت نگاهداشتن pH محیط کشت بر روی pH مطلوب رشد باکتریهای مورد نظر در افزایش جمعیت باکتریهای لاکتیک مورد آزمایش بسیار مؤثر بوده است. جمعیت میکروبی استرپتوکوکوس ترموفیلوس ۱۰ ساعت بعد از کشت در شیر خشک بازساخته 3×10^8 واحد کلنی در هر میلی‌لیتر شمارش شد در حالی که در اثر تنظیم و ثابت نگاهداشتن pH محیط کشت بر روی pH=۶/۲ جمعیت میکروبی آن به 14×10^8 واحد کلنی در هر میلی‌لیتر رسید که در مقایسه با حالت قبلی ۴/۷ برابر افزایش را نشان می‌دهد. این نتیجه در رابطه با تغییرات جمعیت میکروبی لاکتوباسیلوس بلگاریکوس نیز صدق می‌کند بطوریکه



شکل ۱- بررسی تأثیر pH در طی مدت انکوباسیون بر روی جمعیت استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس بلگاریکوس

R: منظور تنظیم pH در طی مدت انکوباسیون

W.R: عدم تنظیم pH در طی مدت انکوباسیون

1 - Single Stimulus

2- Hedonic

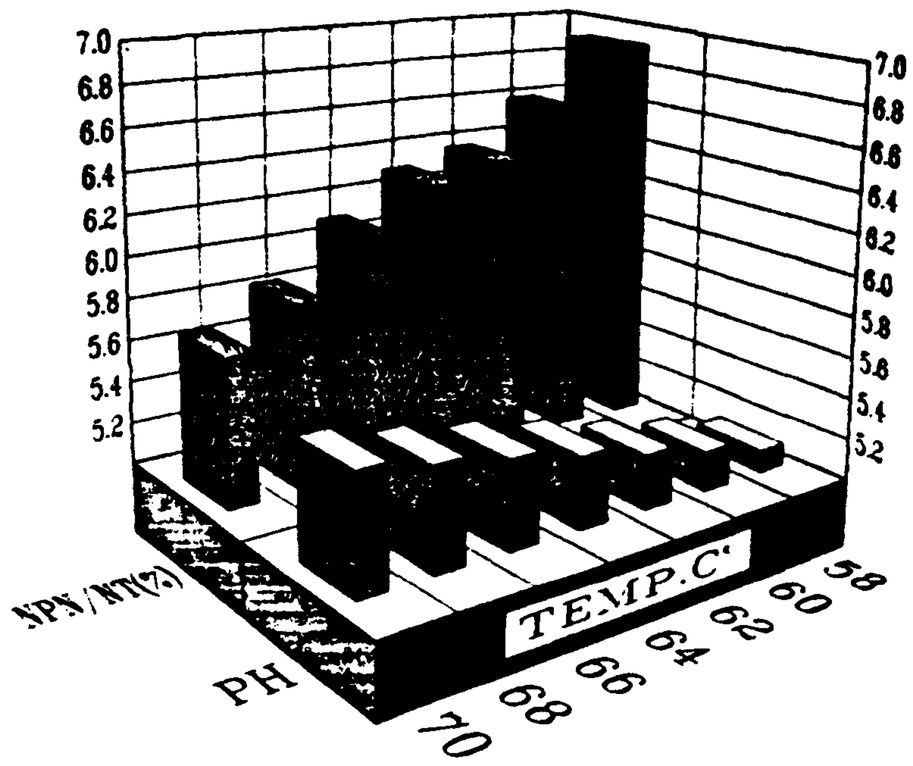
جمعیت میکروبی آن از $۱۰^{۱۰}$ واحد کلنی در هر میلی‌لیتر به ۵×۱۰^{۱۰} واحد کلنی افزایش داشته است و ۵ برابر افزایش جمعیت میکروبی بیانگر میزان تأثیر ثابت بودن pH محیط کشت در طی مدت انکوباسیون می‌باشد.

در شکل‌های ۲ و ۳ تأثیر درجه حرارت‌های مختلف در زمان ثابت و زمانهای مختلف در درجه حرارت ثابت بر روی تأخیر تولید اسیدلاکتیک باکتریهای مورد نظر آورده شده است. نتایج نشان داد که با افزایش درجه حرارت و زمان شوک حرارتی pH پنیرهای تولید شده با استارترهای باکتریهای لاکتیک حرارت دیده افزایش پیدا می‌کند بطوریکه در مقایسه با pH نمونه شاهد میزان افزایش کاملاً محسوس می‌باشد. همچنین تأثیر درجه حرارت‌ها و زمانهای مختلف شوک حرارتی بر فعالیت پروتئولیتیکی باکتریهای مورد نظر در شکل‌های فوق نشان داده شده است. نتایج بدست آمده نشان داد که با افزایش درجه حرارت و زمان شوک حرارتی ازت غیرپروتئینی پنیرهای تهیه شده با استارترهای مزبور کاهش می‌یابد.

نقش سوسپانسیون استارتر باکتریهای حرارت دیده و نیز استارتر باکتریهای لاکتیک فعال (حرارت ندیده) در میزان پروتئولیز ۴ گروه پنیر تهیه شده از آنها در شکل ۴ آورده شده است. در جدول ۱ تجزیه واریانس مربوط به ازت غیرپروتئینی براساس گروههای مختلف پنیرهای تهیه شده نشان داده شده است. نتایج مندرج در این جدول نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) بین مقادیر ازت غیرپروتئینی گروههای مختلف پنیر وجود دارد. جدول ۲ اختلافات موجود بین میانگین تیمارها در سطح یک درصد خطا (آزمون دانکن) را نشان میدهد. با توجه به این جدول اختلاف موجود بین میانگین تیمارها به شرح زیر می‌باشد:

- تیمار ۲ با تیمار ۴ در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار دارد.
- تیمار ۱ با تیمار ۴ در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار دارد.
- تیمار ۳ با تیمار ۴ در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار دارد.
- تیمار ۳ با تیمار ۲ در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار دارد.
- تیمار ۳ با تیمار ۱ در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار دارد.

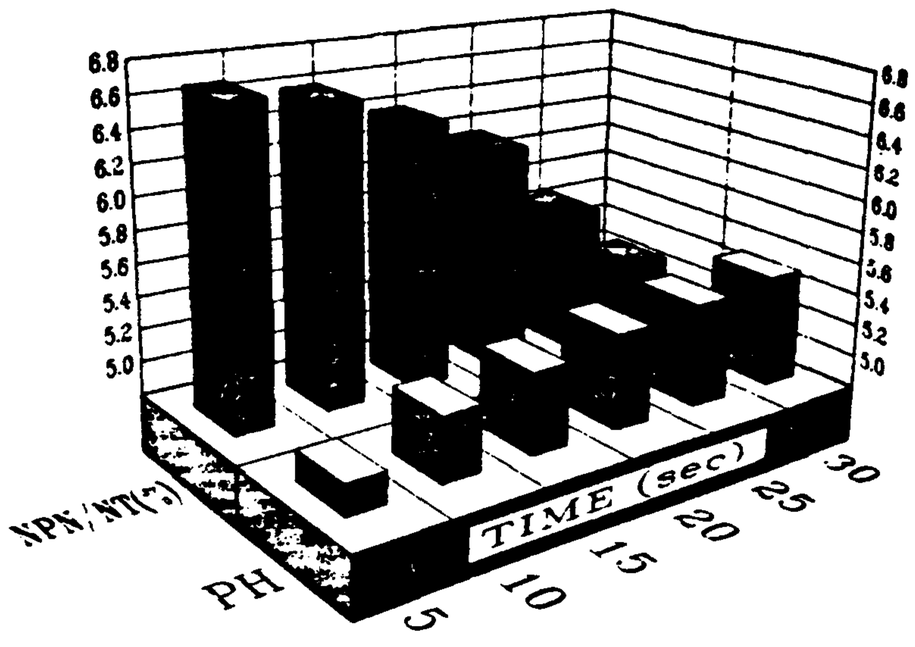
بررسی کمترین و بالاترین میانگین بین گروهها نشان داد که بالاترین میانگین را گروه ۳ دارد و بین این گروه با سایر گروهها اختلاف معنی‌دار است و همچنین گروه ۴ از کمترین میانگین برخوردار بوده و بین این گروه و سایر گروهها نیز اختلاف معنی‌داری



شکل ۲ - ارزیابی تأثیر درجه حرارتهای مختلف شوک حرارتی بر روی فعالیت پروتئولیتیکی* باکتریهای لاکتیک حرارت دیده

* براساس اندازه‌گیری ازت غیرپروتئینی بر حسب درصد ازت کل

(زمان حرارت دهی ثابت: ۱۰ ثانیه)



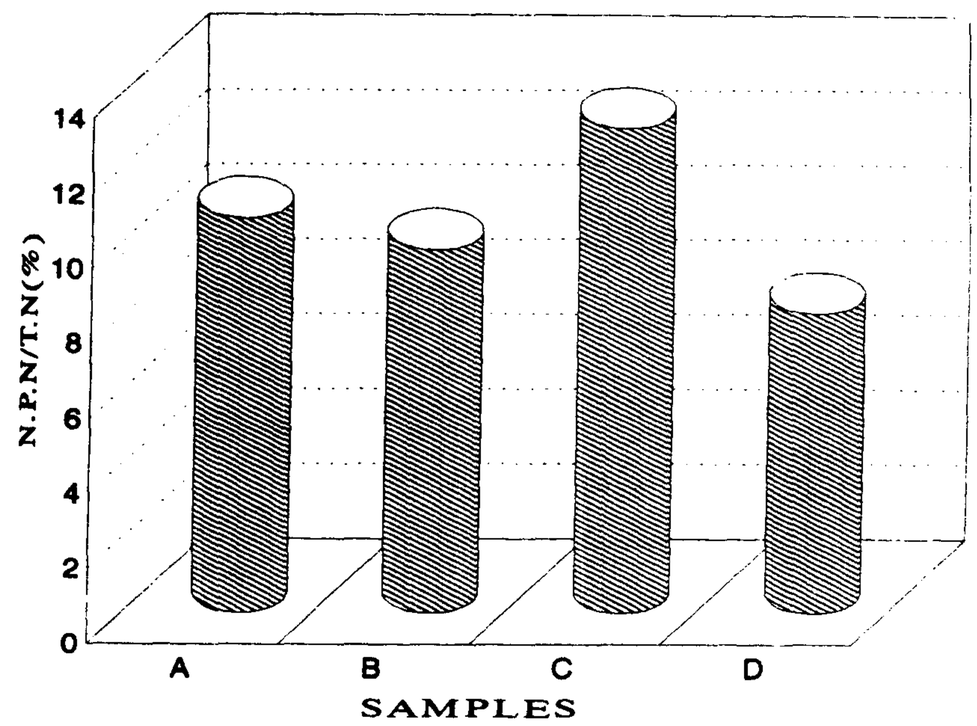
شکل ۳ - تأثیر زمان حرارت‌دهی سوسپانسیون باکتریهای لاکتیک بر روی فعالیت پروتئولیتیکی*

* براساس اندازه‌گیری ازت غیرپروتئینی بر حسب درصد ازت کل

(درجه حرارت ثابت: ۶۰ درجه سانتیگراد)

وجود دارد. اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروههای ۱ و ۲ وجود نداشته و بدین ترتیب گروه ۳ بهترین انتخاب برای تهیه پنیر می‌باشد.

ویژگی پنیرهای گروه ۱ و گروه ۳ مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی میزان پروتئولیز دو گروه در شکل ۵ آورده شده است. همانطور که در شکل نشان داده شده است



شکل ۴ - ارزیابی میزان پروتئولیز* در پنیرهای تهیه شده با سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده و استارتر معمولی (بعد از ۱۰ روز نگهداری پنیر در آب - نمک)

* براساس محاسبه ازت غیرپروتئینی بر حسب درصد ازت کل

A: پنیر تهیه شده با استارتر معمولی (فعال) - نمونه شاهد

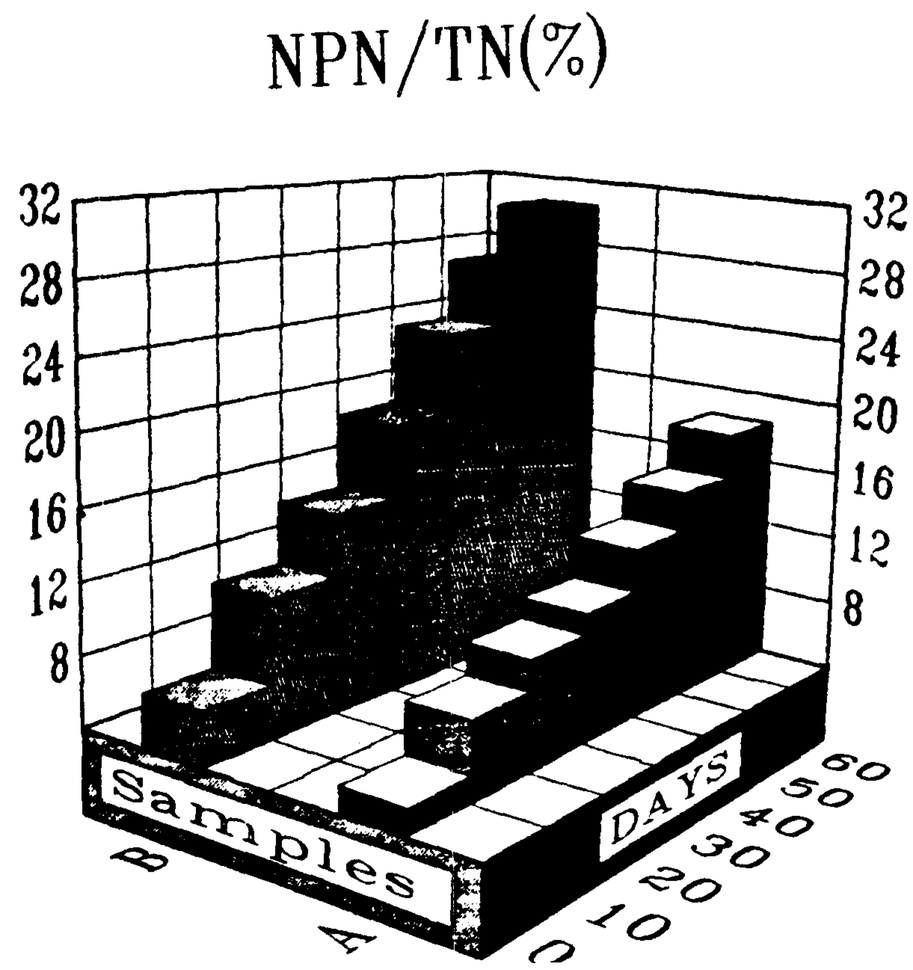
B: پنیر تهیه شده با سوسپانسیون باکتریهای لاکتیک حرارت دیده

C: پنیر تهیه شده با استارتر فعال همراه با سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده (pH در طی مدت انکوباسیون تنظیم گردید).

D: پنیر تهیه شده با استارتر فعال همراه با سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده (بدون تنظیم pH در طی مدت انکوباسیون)

میزان ازت غیرپروتئینی پنیر گروه ۳ نسبت به گروه ۱ (شاهد) افزایش قابل توجهی در طی دوران رسیدن داشته است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها در جدول ۳ آورده شده است. نتیجه بدست آمده نشان داد که تغییرات ازت غیرپروتئینی (NPN) نسبت به زمانها (T) و تیمارهای مختلف (V) اختلاف معنی‌داری ($P<0/01$) دارد و همچنین فاکتورهای زمان (T) و تیمار (V) اثرات متقابل نشان می‌دهند که در سطح ۰/۱ درصد خطا معنی‌دار است.

در شکل ٦ تغییرات مادهٔ خشک دو گروه پنیر در طی دوره نگهداری آنها در آب - نمک ۱۱ درصد نشان داده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده میزان ماده خشک هر دو گروه در طی دوره رسیدن مرتباً در حال کاهش می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج مندرج در این جدول نشان می‌دهد که تغییرات ماده خشک (MD) نسبت به زمانها

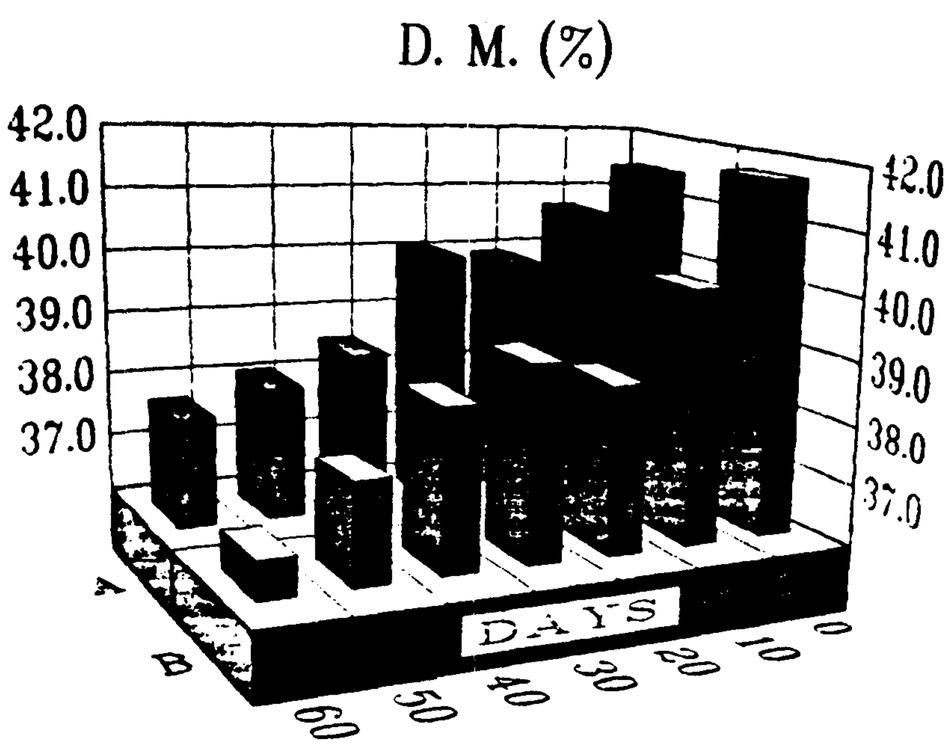


شکل ۵ - تأثیر استفاده از سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده روی پروتئولیز*

* براساس اندازه‌گیری ازت غیرپروتئینی بر حسب درصد ازت کل

A: نمونه شاهد

B: نمونه تهیه شده با سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده



شکل ٦ - تغییرات ماده خشک پنیرها در طی دوره رسیدن

A: نمونه شاهد

B: نمونه تهیه شده با سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده

(T) و تیمارهای مختلف (V) اختلاف معنی‌داری ($P<0/01$) دارد. فاکتورهای زمان (T) و تیمار (V) اثرات متقابل نشان ندادند که

جدول ۱ - تجزیه واریانس مربوط بـه ازت غـیرپروتئینی چـهار گروه پنیر

منابع تغییرات	جمع مربعات	درجات آزادی	میانگین مربعات	F
بین‌تیمارها	۳۸/۰۸۸۸	۳	۱۲/۶۹۶۳**	۲۲/۶۷۹۳
خطا	۴/۴۷۵۰	۸	۰/۵۵۹۴	
کل	۴۲/۵۶۳۸	۱۱		

** : در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار است.

جدول ۲ - اختلافات موجود بین میانگین تیمارها در سطح یک درصد خطا (آزمون دانکن)

۳	۱	۲	۴	تیمار	میانگین
				۴	۷/۹۸۰۰
			*	۲	۹/۶۶۰۰
			*	۱	۱۰/۵۱۰۰
*		*	*	۳	۱۲/۹۲۰۰

* : علامت وجود اختلاف معنی‌دار)

جدول ۳- تجزیه واریانس مربوط به ازت غیرپروتئینی براساس دو گروه پنیر و زمان

منابع تغییرات	جمع مربعات	درجات آزادی	میانگین مربعات	F
اثرات اصلی				
زمان	۰/۶۶۵	۶	۰/۱۱۱	۱۰۷/۲۶۸**
واریته	۰/۳۸۳	۱	۰/۳۸۳	۳۷۰/۵۹۲**
اثرات متقابل				
زمان-واریته	۰/۰۹۳	۶	۰/۰۱۵	۱۴/۹۴۰**

** : در سطح : ۱٪ اختلاف معنی‌دار است.

این موضوع بیانگر این است که هر دو تیمار نسبت به زمان در رابطه با تغییرات ماده خشک عکس‌العمل یکسان دارند و اختلاف بـین آنـها معنی‌دار نیست.نتیجه بدست آمده از اندازه‌گیری pH دو گروه پنیر در طی دوره رسیدن در شکل ۷ نشان داده شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که رفتار هر دو تیمار نسبت به زمان در رابطه با تغییرات pH یکسان می‌باشد و اختلاف بین آنها معنی‌دار نمی‌باشد.

نتایج بدست آمده از ارزیابی خصوصیات چشایی دو گـروه پنیر در جدول ۵ نشان داده شده است. جدول ٦ نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس را نشان میدهد. نتایج مـندرج در ایـن جـدول نشـان می‌دهد کـه تـغییرات خـصوصیات چشـایی (F) نسـبت بـه زمـان و تیمارهای مـختلف (V) اخـتلاف مـعنی‌داری دارد ($P<0/01$) . فاکتورهای زمان و تیمار اثرات متقابل نشان دادند که بـا ۹۵ درصـد اطمینان معنی‌دار است.

بحث

نتایج این تحقیق تأیید کننده این واقعیت بود که pH مطلوب برای فعالیت لاکتوباسیلوس بلگاریکوس در قیاس با استرپتوکوکوس ترموفیلوس کمتر می‌باشد. نتایج حاصل از این بررسی با نـتایج سـایر تجربیات در زمینه شناخت شرایط بهینه رشد این دو مـیکروب مـایه ماست تطبیق می‌نماید (۳۴).درکاربردمخلوط این دو باکتری به نسبت مساوی نیز همواره استرپتوکوکوس ترموفیلوس شروع تخمیر اسیدی را بعهده دارد و باکاهش نسـبی pH زمـینه فـعالیت لاکـتوباسیلوس بلگاریکوس تأمین می‌شود.(۳، ۱۱و۳۴).

تنظیم دائمی pH محیط کشت براساس pH مطلوب فعالیت میکروبها نتایج بسیار چشم‌گیری را ببار می‌آورد و زمان تجدید نسل[1] راکوتاه نموده و ضریب رشد[2] را بشدت بالا می‌برد (۳۰ و ۳۴). در این تحقیق تنظیم pH محیط بر روی pH مطلوب فعالیت باکتریهای مـورد نـظر سـبب افـزایش ۴۷۰ درصـد جـمعیت اسـترپتوکوکوس ترموفیلوس و ۵۰۰ درصـد جـمعیت لاکـتوباسیلوس بـلگاریکوس گردید. این اعداد قبل از هر چیز ما را به این نتیجه‌گیری می‌رساند که در صورت استفاده از این روش می‌بایستی از فـرمانتورهایی اسـتفاده نمود که مجهز به سیستم کنترل دائمی pH بـاشند. مـقایسه جـمعیت میکروبی نهایی در هر دو کشت نشان داد که ضریب رشد در حالت

1 - Generation time 2- Growth rate

جدول ۴ - تجزیه واریانس مربوط به تغییرات ماده خشک براساس دو گروه پنیر و زمان

منابع تغییرات	جمع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
اثرات اصلی				
زمان	۸۲/۴۸۴	۶	۱۳/۷۴۷	۲۸/۵۱۰**
واریته	۴/۱۴۹	۱	۴/۱۴۹	۸/۶۰۴**
اثرات متقابل				
زمان - واریته	۳/۱۸۱	۶	۰/۵۳۰	۱/۰۹۹**
باقیمانده	۱۳/۵۰۱	۲۸	۰/۴۸۲	
کل	۱۰۳/۳۱۵	۴۱	۲/۵۲۰	

** : در سطح ۱ % اختلاف معنی‌دار است.

جدول ۵ - نتایج حاصل از آزمون چشایی بر روی نمونه‌های پنیر از نظر تأثیر سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده

مقیاس هدونیک	ارزش‌گذاری کمی	تعداد داوران و جمع امتیازات (در مدت زمان نگهداری "روز")															
		گروه ۱ (شاهد)								گروه ۲							
		۲۰		۴۰		۶۰		۲۰		۴۰		۶۰					
		تعداد داوران	جمع امتیاز	تعداد داوران	جمع امتیاز	تعداد داوران	جمع امتیاز	تعداد داوران	جمع امتیاز	تعداد داوران	جمع امتیاز	تعداد داوران	جمع امتیاز	تعداد داوران	جمع امتیاز	تعداد داوران	جمع امتیاز
خیلی خوب	۲+	۲	۴+	۳	۶+	۳	۶+	۳	۶+	۳	۶+	۴	۸+
خوب	۱+	۳	۳+	۲	۲+	۳	۳+	۲	۲+	۴	۴+	۵	۵+
قابل قبول	۰	۳	۰	۴	۰	۳	۰	۴	۰	۳	۰	۱	۰
بد	۱-	۱	۱-	۱	۱-	۱	۱-	۱	۱-	۰	۰	۰	۰
خیلی بد	۲-	۱	۲-	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
جمع	-	۱۰	۴+	۱۰	۷+	۱۰	۸+	۱۰	۷+	۱۰	۱۰+	۱۰	۱۳+

ثابت نگاهداشتن pH محیط کشت در طی انکوباسیون ٦٦ درصد بیش از نمونه‌هایی بوده است که بصورت متناوب با فواصل زمانی ثابت pH محیط کشت آنها تنظیم نشده است. نتیجه حاصل از این بررسی ما را به این ملاحظات هدایت می‌کند که در صورت عدم تنظیم pH محیط و تخمیر خودبخودی بهره و کارآیی تولید مایه بسیار نازلتر خواهد بود. (۲ ، ۴ ، ١٦ و ۳۴).

نتایج بدست آمده از تأثیر تغییرات درجه حرارت و زمان شوک حرارتی بر روی فعالیت تولید اسیدلاکتیک و پروتئولیتیکی باکتریهای لاکتیکی مورد نظر دارای انسجام قابل ملاحظه‌ای بوده‌اند. افزایش درجه حرارت در زمان ثابت در طی فرآیند شوک حرارتی بر روی باکتریهای مورد نظر استفاده جهت تسریع رسیدن پنیر منجر به نتایجی در محصول بدست آمده گردید. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که فرآیند شوک حرارتی هم به قدرت تخمیر لاکتیکی باکتریهای و هم به توان پروتئولیتیکی آنها صدمه وارد نموده است (۴ ، ۷ ، ۸ و ١٦). در حرارتهای $58^{\circ}C$ و $70^{\circ}C$ در زمان ثابت (۱۰ ثانیه) قدرت پروتئولیتیکی باکتریها بیش از ۲۰ درصد کاهش یافته است ضمن اینکه pH نهایی در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد ۰/۴۳ واحد بالاتر بوده است.

از کاربرد تغییرات زمان شوک حرارتی در درجه حرارت ثابت (٦۰ درجه سانتیگراد) نیز نتایج مشابهی بدست آمده است که در این مورد نحوهٔ تأثیر بر کاهش فعالیت اسیدسازی یکنواخت بوده و بنظر می‌رسد که بین زمانهای ۵ تا ۱۵ ثانیه تخریب فعالیت پروتئولیتیکی کمتر بوده و از ۱۵ ثانیه به بالا این تخریب دامنه شدیدتری یافته است. در تکمیل مطلب فوق ملاحظه میشود که بین زمانهای ۵ و ۱۵ ثانیه کاهش ازت غیرپروتئینی آزاد شده فقط ۴/۴ درصد بوده است در حالی که بین زمانهای ۱۵ و ۲۵ ثانیه این میزان به ۱۲/۸ درصد رسیده است که بدین ترتیب در این فاصله زمانی مساوی افت توان پروتئولیتیکی در حدود ۳۰۰ درصد بیش از زمان مشابه قبلی بوده است. کاهش قدرت پروتئولیتیکی باکتریهای مورد نظر در زمانهای بین ۲۵ تا ۳۰ ثانیه ۸/۴ درصد را نشان داد که بعبارت بهتر تأثیر بر تخریب فعالیت پروتئولیتیکی در ۵ ثانیه آخر نزدیک به ۲ برابر ۱۰ ثانیه آغاز حرارت دادن بوده است. این ملاحظات دقیقاً با قوانین مرگ حرارتی میکر و ارگانیزمها تطبیق می‌نماید به این ترتیب که در حرارت ثابت هر چه زمان فرآیند حرارتی طولانی‌تر شود اثر کشندهٔ واحد زمان بصورت متفاوتی خود را نشان می‌دهد (۳۰ و ۳۴). از نتایج حاصل از این بررسی به این نتیجه می‌رسیم که از $٦٦^{\circ}C$ به بالا و در مدت ۳۰ ثانیه میزان صدمه دیدگی باکتریها بقدری شدید بوده که جمعیت باقیمانده دارای آثار قابل توجهی در تولید اسید نمی‌باشد و اگر بخواهیم به مایه کشت‌هایی دسترسی یابیم که تقریباً از نظر تخمیر لاکتیکی فاقد فعالیت باشند می‌توانیم دمای ٦۸ و ۷۰ درجه سانتیگراد در ۳۰ ثانیه را بکار ببریم. افت فعالیت اسیدسازی در زمانهای کوتاهتر در دمای ٦۸ و ۷۰ درجه سانتیگراد کاهش می‌یابد مثلاً در ۲۵ ثانیه هنوز کاهش میزان pH معادل ۰/۰۵ واحد می‌باشد که این کاهش معادل با نتایج بدست آمده بین ٦٦ و ٦۸ درجه سانتیگراد است بنابراین در این حالت نیز درجه قدرت تخمیر لاکتیکی با شدت بیشتری کاهش پیدا می‌کند. نتایج بدست آمده از ۲۰ ثانیه حرارت‌دهی در همان درجه حرارتها نشاندهندهٔ تأثیر متوقف کننده تولید اسید است و در درجه حرارتهای ۵۸ تا ۷۰ درجه سانتیگراد این روند در شرایط یکسانی انجام می‌شود و اختلاف در pH محصول نهایی در دماهای ٦۸ و ۷۰ درجه سانتیگراد در حدود ۰/۱۲ واحد است که در مقایسه با موارد پیشین بسیار قابل توجه می‌باشد. پدیده یکنواختی کاهش فعالیت اسیدسازی در مدت ۱۵ ثانیه حرارت‌دهی در همان درجه حرارتها کماکان مشاهده میشود و این روند در ۱۰ و ۵ ثانیه با شدت یکسانی تکرار می‌گردد. از بررسیهای فوق می‌توان چنین نتیجه گرفت که در فرآیند شوک حرارتی زمان و درجه حرارتی مطلوب‌تر است که ازت غیر پروتئینی بیشتری تولید گردد بشرطی که pH به کمتر از ۴/٦ (نقطه ایزوالکتریک کازئین) نرسد (۳ و ۱۵). در هیچکدام از نمونه‌های مورد آزمایش بعد از ۱۰ روز آزمایش pH محصول نهایی به pHهای کمتر از ۴/٦ نرسید و با توجه به اینکه هدف شوک حرارتی کاهش دوره رسیدن پنیر می‌باشد بنابراین در مقطع فعلی این نتایج ما را به انتخاب زمانها و درجه حرارتهای کمتر هدایت می‌کند. پیش‌بینی می‌نماییم که کاربرد بهینه سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده در زمانی کمتر از یکماه ما را به درجه‌ای از پروتئولیز قابل مقایسه با نمونه‌های معمولی (نگهداری شده در مدت ۲ ماه) میرساند. با توجه به نتایج فوق شرایط بهینه جهت فرآیند شوک حرارتی دمای $٦۰^{\circ}C$ و زمان ۱۰ ثانیه می‌باشد. (۴ ، ۷ ، ۸ ، ۲۰ و ۳۰).

نتایج حاصل از بررسی تفاوت شدت پروتئولیز در چهار

گروه پنیر تهیه شده ما را به ملاحظات زیر میرساند:

بیشترین پروتئولیز در نمونه‌ای مشاهده گردید که در تولید آن از یک درصد استارتر فعال و ۲ درصد مایه کشت حرارت دیده (که pH آن در طی مدت انکوباسیون تنظیم و ثابت نگاهداشته شده بود) استفاده شده بود و کمترین پروتئولیز در پنیری دیده شد که در تهیه آن صرفاً ۲ درصد مایه کشت حرارت دیده بکار رفته بود و جمعیت میکروبی آن نیز بعلت عدم تنظیم مداوم pH در مدت انکوباسیون در حد پایین‌تری قرار داشت. بین نمونه شاهد و نمونه‌ای که در تهیه آن از ۲ درصد سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده (با جمعیت میکروبی بالا) استفاده شده بود تفاوت چشم‌گیری در پروتئولیز مشاهده نمی‌شود بنابراین یکی از مهمترین فاکتورهای تأمین پروتئولیز مناسب کاربرد کشتی است که جمعیت میکروبی آن در حد بالایی باشد بعبارت دیگر حتی با اعمال شوک حرارتی و کاهش نسبی فعالیت پروتئولیتیکی میکروبها این فعالیت آنقدر حفظ می‌گردد که هیدرولیز پروتئین‌های پنیر را بنحو محسوسی انجام دهد. با مبنا قرار دادن ضعیف‌ترین پروتئولیز ایجاد شده در نمونه‌های پنیر به نتایج زیر میرسیم:

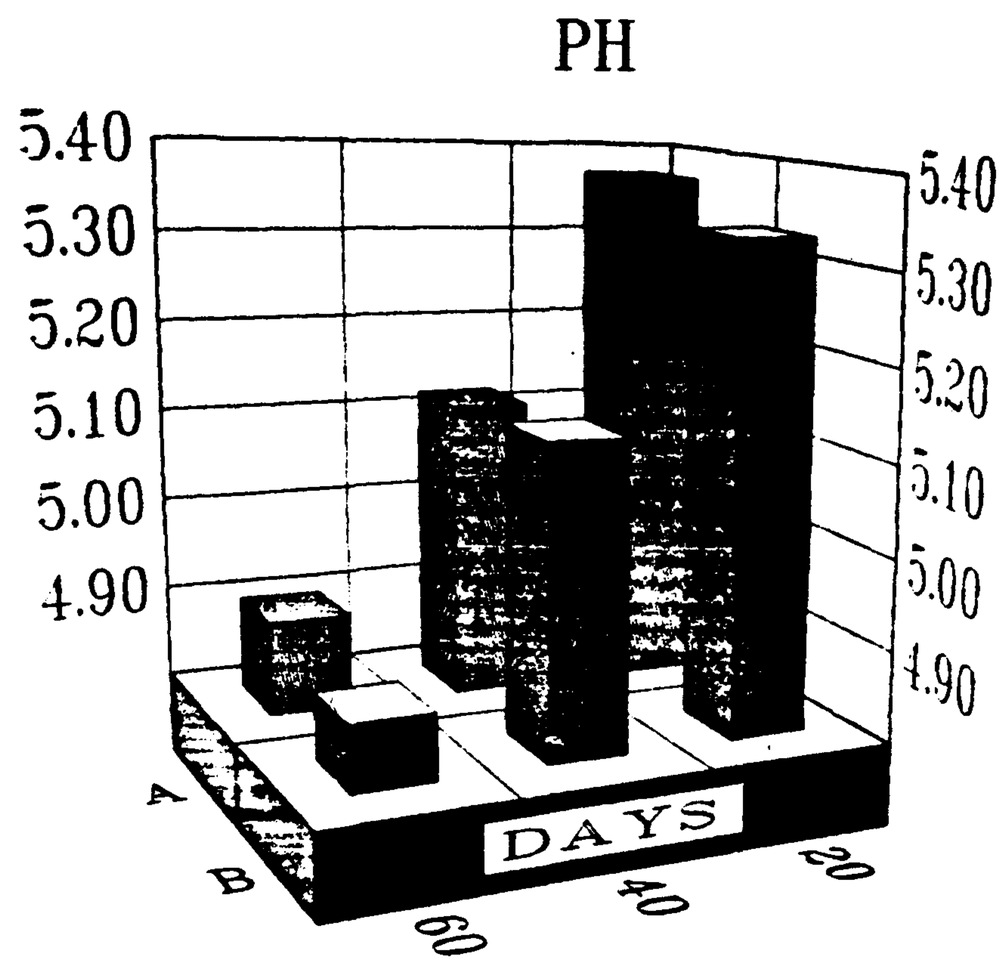
تفاوت پروتئولیز نمونه شاهد با نمونه‌ای که صرفاً در تهیه آن از باکتریهای حرارت دیده با جمعیت میکروبی نسبتاً کم استفاده شده بود (بعلت عدم تنظیم pH) برابر با ۳۱/۷ درصد بعد از ۱۰ روز نگهداری است. این تفاوت با نمونه حاوی استارتر معمولی و مایه کشت حرارت دیده با جمعیت میکروبی بالا به ۶۲ درصد میرسد یعنی تفاوت پروتئولیز دو نمونه ذکر شده با ضعیف‌ترین نمونه حدود ۱۰۰ درصد می‌باشد. تفاوت ذکر شده با نمونه‌ای که دقیقاً در همین شرایط تهیه شده ولی مایه کشت استفاده شده در آن از جمعیت میکروبی بالایی برخوردار بوده ۲۱ درصد است و همچنین تفاوت پروتئولیز در دو نمونه شاهد و نمونه تهیه شده از مایه کشت حرارت دیده با جمعیت میکروبی بالا فقط کمی بیش از ۸ درصد بوده است. نتایج حاصل از این تحقیق مجدداً تأثیر مفید کاربرد دو عامل مخلوط استارتر معمولی و سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده با جمعیت میکروبی بالا را نشان می‌دهد (۱۴ ، ۳۰ ، ۳۲ ، ۳۳ و ۳۴) و ضمناً به این نتیجه می‌رسیم که می‌توان با یک کشت قوی و بدون کاربرد استارتر معمولی پنیرهایی ساخت که از پروتئولیز کافی برخوردار باشند اما طبعاً pH نهایی آنها در حد بالاتری نیز قرار خواهد داشت. چنین کاربردی برای پنیرهایی که زمان تولید تا مصرف آنها کوتاه است کاملاً قابل توصیه می‌باشد مشروط بر آن که شرایط نگهداری آنها بهداشتی باشد. بنظر نمیرسد که کاربرد مایه کشت‌های حرارت دیده با جمعیت میکروبی پایین منجر به حصول فرآورده مطلوب در زمان کوتاهی شود چرا که افزایش زمان نگهداری برای رسیدن به میزان پروتئولیز مطلوب با توجه به pH بالای محصول ممکن است پیامدهای نامساعدی را بدنبال داشته باشد.

اندازه‌گیری روند پروتئولیز در دو نوع پنیر تهیه شده (نمونه)

جدول ۶ - تجزیه واریانس مربوط به ویژگی چشایی براساس دو گروه پنیر و زمان

منابع تغییرات	جمع مربعات	درجات آزادی	میانگین مربعات	F
اثرات اصلی				
زمان	۹۶/۳۳۳	۲	۴۸/۱۶۷	۴۵/۶۳۲**
واریته	۹۳/۳۸۹	۱	۹۳/۳۸۹	۸۸/۴۷۴**
اثرات متقابل				
زمان - واریته	۱۰/۱۱۱	۲	۵/۰۵۶	۴/۷۸۹**
باقیمانده	۱۲/۶۶۷	۱۲	۱/۰۵۶	
کل	۲۱۲/۵۰۰	۱۷	۱۲/۵۰۰	

** : در سطح ۱% اختلاف معنی‌دار است.



شکل ۷ - تغییرات pH پنیرها در طی دوره رسیدن

A: نمونه شاهد

B: نمونه تهیه شده با سوسپانسیون باکتریهای حرارت دیده

شاهد و نمونه‌ای که در آن از استارتر حرارت دیده استفاده شده‌بود). نشان داد که در تمام مقاطع نمونه‌برداری درصد ازت غیرپروتئینی نمونه تهیه شده از مخلوط استارتر فعال و مایه کشت حرارت دیده در قیاس با نمونه شاهد بیشتر بوده و این اختلاف با پیشرفت زمان رسیدن افزایش یافته است. بعنوان مثال بعد از ۱۰ روز نگهداری تفاوت پروتئولیز با مبنا قرار دادن نمونه شاهد ۵۰ درصد بوده است در حالیکه در روز شصتم این تفاوت به بیش از ۶۰ درصد بالغ گردیده است و از طرف دیگر در نمونه شاهد تفاوت شدت پروتئولیز در روز شصتم و دهم نگهداری کمی بیش از ۹۵ درصد می‌باشد که این اختلاف در نمونه تهیه شده از مخلوط استارتر فعال و مایه کشت حرارت دیده ۱۲۲ درصد بوده است. در صورت مبنا قرار دادن روز تولید این تفاوت‌ها به نحو چشم‌گیری افزایش خواهد داشت و به ترتیب ۱۵۶ درصد برای نمونه شاهد و ۲۶۶ درصد برای پنیر تهیه شده از مایه کشت حرارت دیده خواهد بود. با مبنا قرار دادن شصتمین روز نگهداری بعنوان حد پایانی رسیدن پنیر معمولی به این نتیجه میرسیم که در نمونه تهیه شده از باکتریهای حرارت دیده بعد از ۲۰ روز نگهداری به بیش از همان درجه از پروتئولیز می‌رسیم. نتیجه کل این کار تحقیقاتی که در واقع در شکل ۵ خلاصه شده است بیانگر این است که در نمونه شاهد بعد از شصت روز نسبت ازت غیرپروتئینی به ازت کل کمتر از ۱۵ درصد است در حالی که در نمونه دیگر همین نسبت را بعد از ۳۰ روز نگهداری ملاحظه می‌کنیم.

یعنی اگر مبنا پیشرفت پروتئولیز بعنوان مهمترین مؤلفه فرآیند رسیدن باشد با استفاده از این تکنیک می‌توان عمررسانیدن پنیرهای ایرانی را به نصف تقلیل داد که علاوه بر مزایای کوتاهی زمان انبارداری پدیدهٔ افت مواد با ارزش در آب نمک مطمئناً کم دامنه‌تر خواهد بود. با توجه به اینکه بسیاری از کارخانجات ایران پنیر خود را بعد از ۴۵ روز روانهٔ بازار می‌نمایند مقایسه پروتئولیز اینوع پنیر با پنیر حاصل از کاربرد باکتریهای حرارت دیده این نتیجه را نشان می‌دهد که بعد از ۲۰ روز به همان نسبت ازت غیرپروتئینی آزاد میشود که در پنیر شاهد بعد از ۴۵ تا ۵۰ روز حاصل می‌گردد.

ارزیابی ویژگیهای چشایی دو نمونه در تمام مقاطع نمونه‌برداری و مقایسه آنها نشان داد که نمونه‌های تهیه شده از باکتریهای حرارت دیده نسبت به نمونه شاهد از مقبولیت بیشتری برخوردار بوده‌اند که علت این امر را می‌توان به پیدایش خواص حسی ناشی از محصولات پروتئولیز نسبت داد. وجود تعداد بیشتری از باکتریهای لاکتیک در اینوع پنیرها عامل مهمی در جلوگیری از آلودگی میکروبی پنیرها و در واقع حفاظت بیولوژیکی نمونه‌هاست که مطمئناً این فاکتور هم در شکل‌گیری خواص حسی فرآورده مؤثر می‌باشد (۱۸ ، ۲۳ و ۳۴). عوامل چشایی مقبولیت بیشتر نمونه‌های تهیه شده از مایه کشت حرارت دیده مطمئناً پپتیدهایی هستند که نوع و مقدار آنها در تجربیات تکمیلی ارزیابی خواهد شد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مؤسسه تحقیقات دامپروری کشور بخاطر فراهم نمودن کلیه امکانات جهت اجرای این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری میشود. ضمناً از همکاران عزیز سرکار خانم کیانا کازرونی و مهندس ناهید لطیفه و آقایان عباس نظریان، فضل‌ا... موسوی ، مهندس حسین رمضانی ، مهندس مسعود بهشتی و عین‌ا... ترابی که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند کمال سپاس را داریم.

REFERENCES

1. Abd El-Salam, M.H. et al. 1978. Effect of Lipases on the Ripening of Egyptian Ras Cheese. J.Dairy Res., 45, 49.
2. Abraham, A.G. et al. 1993. Proteolytic Activity of Lactobacillus bulgaricus Grown in Milk. J.Dairy Sci., 76, 1498.
3. Alais, C. 1984. Science du Lait, Sep, Paris.
4. Arodo, Y. et al. 1988. Accelerated cheese Ripening with the Treated cells of Lactobacillus helveticus and a commercial Proteolytic Enzyme . J.Dairy Res., 55, 239.
5. Bailey, W.R. and Scott. E. 1974. Diagnostic Microbiology. A Textbook for the Isolation and Identification of Pathogenic Microorganisms. 4ed., The C.V. Mosby Company, p, 379.
6. Baron, H.J. And Finegold, S.M. 1990. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. The C.V. Mosby Company, Toronto, U.S.A.
7. Barry, B. et al. 1983. Accelerated Ripening of Cheddar cheese with a Commercial Proteinase and Intracellular Enzymes from starter Streptococci. J. Dairy Res., 50, 519.
8. Bartels , H.J. et al. 1987. Accelerated Ripening of Gouda Cheese: I. Effect of Heat-Shocked Thermophilic Lactobacilli and Streptococci on Proteolysis and Flavour Development. Milchwissenschaft. 42, 83.
9. Bhowmik, T. et al. 1990. Role of Micrococcus and Pediococcus species in Cheese Ripening. A Review. J. Dairy Sci., 73, 859.
10. Buchanan, R.E. et al. 1975. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Waverly Press, INC.
11. Chapman, H.R. and Sharpe, M.E. 1990. In : P.K. Robinson (ed.) Dairy Microbiology : The Microbiology of Milkproducts, vol. 2, Applied Science, London, UK, P. 203.
12. Creamer , L.K. et al. 1982. Rheological Evaluation of Maturing Cheddar Cheese. J.Food Sci., 47,631.
13. Descargues, G. 1984. L'usine de LA Roche Aux Fees. France.
14. Desnouveaux, R. et al. 1985. Les Enzymes Non Coagulantes Dans LA Filiére Lait: Proprietés Utilisations Industrielles Et Développments Futurs. Ministére d'Agriculture, Edition Apria, N°. 37.
15. Eck, A. 1987. Le Fromage, 2 ed, Tec et Doc, Paris.
16. El Abboudi, M. et al 1991. heat-shocked Lactobacilli for Acceleration on Cheddar Cheese Ripening. J. Food Sci., 56, 948.
17. El Neshawy, A.A. et al. 1983. Enhancement of Domiati Cheese Flavour with Animal Lipase Preparations . Food Chemistry. 10, 121.
18. El Soda, M. 1986. Acceleration of cheese Ripening Recent Advances. J. Food Protection. 49, 395.
19. El Soda, M. et al. 1989. Microencapsulate Enzyme Systems for the Acceleration of Cheese Ripening. J. Microencapsulation. b(3), 319.

20.Ezzat, N. 1990. Accelerated Ripening of Ras Cheese with a commercial Proteinase and Intracellular Enzymes from Lactobacillus bulgaricus, Propionibacterium fredenreichii and Brevibacterium linens. Lait, 70, 459.

21.Furtado, M.M. et al. 1988. Characterization of Nitrogen Fractions During Ripening of a Soft Cheese Made from Ultrafiltration Retentates. J. Dairy Sci., 71, 2877.

22.Khalid, N.M. 1990. Lactobacilli-Their Enzymes and Role in Ripening and Spoilage of Cheese. A Review. J. Dairy Sci., 37, 2669.

23.Kristofferson, T. et al. 1970. Cheddar Flavour . IV. Directed and Accelerated Ripening process. J. Dairy Sci., 50, 292.

24.Law, B.A. 1980. Accelerated Ripening of Cheese. Dairy Industries International , Vol. 45, 15.

25.Law, B.A. et al. 1982 . Accelerated Cheese Ripening with Food Grade Proteinases. J. Dairy Res., 49, 137.

26.Law, B.A. 1982. In: P.F. Fox and J.J. Condon (ed.) Food Proteins . Applied Science Publishers LtD, UK. P. 307.

27.Law, B.A. et al. 1992. Proteolysis and Flavour Development in Cheddar Cheese made with the Single Starter strains Lactococcus lacits ssp. Lactis UC 317 or Lactococcus lactis ssp. cremoris HP. J. Dairy Sci., 75,1173.

28.Meyer, L.H. 1987. Food Chemistry, C.B.S. Publishers and Distributors, India, P. 306.

29.Microbiology Manual Merck. 1990. E. Merck, P.O.B. 411 9, Frankfurter Strasse 250, Darmsta dt 1.

30.Petterson, H.E. et al. 1975. Accelerated Cheese Ripening. A method for Incereasing the Number of Lactic Bacteria in Cheese without Deterimental Effects of the Cheese making process and its Effects on the Cheese Ripening.J. Dairy Res., 43, 97.

31.Schlesser, J.E. et al. 1992. Characterization of Chemical and Physical changes in Camembert Cheese During Ripening. J. Dairy Sci., 75, 1753.

32.Trepanier, G. et al., 1992. Accelerated Maturation of Cheddar Cheese : Influence of Added Lactobacilli and Camercial Protease on composition and Texture. J. Food Sci., 57, 898.

33.Tsakalidou, E. et al. 1993. A Comparative study : Aminopeptidase Activities from Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus and Streptoccus thermophilus. J. Dairy Sci., 76, 2145.

34.Vafopoulou, A. 1989. Accelerated Ripening of Feta cheese with Heat Shocked Cultures or Microbial Proteinases. J. Dairy Res., 56, 285.

35.Zaki, N . and Salem, S.A. 1992. Effect of Proteolytic Enzymes on Accelerated Ripening of Edam Cheese. Indian J. Dairy Sci., 45, 303.

Iranian J. Agric. Sci. Vol. 29 No. 2 1998

Accelerated Proteolysis of Iranian Brine Cheese with Heat -Shocked Lactic Bacteria Cultures.

S.AZARNIA , M.R. EHSANI, S.A.MIRHADI

Animal Husbandry Research Institute (M.Sc.), Karaj-Iran, Associate Professor , Department of Food Technology , College of Agriculture, University of Tehran, Researcher of Animal Husbandry Research Institute , Karaj-Iran.

Accepted 6 Jan. 1998

SUMMARY

Reducing the ripening time of Iranian brine cheese was the aim of this study. In this investigation, the lactic bacteria such as *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* were shocked by heat. The results showed that the optimal pH activity of *L.bulgaricus* slightly was lower than that of *Str.thermophilus* . The results obtained from total count tests during incubation approved that the permanent pH adjustment has a positive effect on the reducing of generation time, increasing of growth rate and effectiveness of culture. The results related to the best temperature time used as the conditions for heat shock for getting the least lactic acid production as well as best proteolysis activity were 60 $^{\circ}C$ during 10 seconds. The proteolysis activity was evaluated by measuring the rate of non-protein nitrogen (NPN) on total nitrogen and our results displayed that a mixture of two percent of heat shocked microorganisms besides one percent of ordinary culture give the best performance. The results showed that the amount of NPN in curds in which the heat shocked culture had been used after twenty days preservation into 11% brine was as high as the quantity of NPN after 60 days ripening at the same conditions in witness samples. A significant differences were not considered in the pH and total solids of two kinds of products ($P>0.05$), but organoleptic tests showed a superiority of the cheeses produced by using heat shocked lactic bacteria ($P<0.01$).

Key words: Brine cheese, Ripening, Accelerated Ripening, Heat Shock, Lactic bacteria & Proteolysis