

تأثیر لاکتوباسیلوس پلانتاروم تضعیف شده به عنوان آغازگر الحاقی بر لیپولیز و ویژگی‌های حسی پنیر سفید فراپالایشی

رامین عطازاده^{۱*}، گیتی کریم^۲، جواد حصاری^۳، شهرام حنیفیان^۴

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، تهران، ایران.

۲- استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۴- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، تبریز، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات: r.atazadeh@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۱/۱۲/۱۰ پذیرش نهایی: ۹۲/۲/۷)

چکیده

هدف اصلی از این مطالعه تعیین تأثیر استفاده از آغازگر الحاقی تضعیف شده لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر فرآیند لیپولیز در پنیر سفید فراپالایشی (UF) از طریق اندازه‌گیری اندیس اسیدیته، پروفیل اسیدهای چرب، ویژگی‌های شیمیایی، میکروبی و حسی در طول دوره رسیدن بود. نتایج حاصل نشان داد پنیر UF حاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم تضعیف شده در مقایسه با پنی‌های شاهد از نظر ترکیب شیمیایی در طول ۶۰ روز دوره رسیدن اختلاف معنی‌داری نداشتند. شمارش کلی باکتری‌ها و شمارش لاکتوباسیل‌های مزوفیل در پنی‌های UF تولید شده با آغازگر الحاقی تضعیف شده بعد از ۴۵ روز رسیدن به طور معنی‌داری ($p < 0.01$) از نمونه‌های شاهد بالاتر بود. نتایج حاصل از پروفیل اسیدهای چرب پنیر سفید فراپالایشی (UF) نشان داد به علت افزایش روند لیپولیز در ۳۰ روز اول رسیدن در نمونه‌های حاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم تضعیف شده درصد اسیدهای چرب با زنجیر کوتاه و متوسط ($C_{4:0}$ - $C_{14:0}$) در مقایسه با گروه شاهد به صورت معنی‌دار ($p < 0.01$) کاهش و درصد اسیدهای چرب با زنجیر بلند ($C_{16:0}$ - $C_{18:3}$) افزایش یافت. اندیس لیپولیزی که بوسیله مقدار کل اسیدهای چرب آزاد نشان داده می‌شود در پنی‌های تولید شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم تضعیف شده به صورت معنی‌داری ($p < 0.01$) بالاتر بود. به علاوه در ارزیابی حسی، پنی‌های UF تولید شده با آغازگر الحاقی تضعیف شده به طور معنی‌داری ($p < 0.01$) به مجموع نمرات بالاتری نسبت به پنی‌های شاهد در روز ۴۵ رسیدند. در نهایت با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد که پنی‌های UF تولید شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم تضعیف شده در مقایسه با پنی‌های شاهد از کیفیت تغذیه‌ای بالاتری برخوردار باشند.

واژه‌های کلیدی: آغازگر الحاقی تضعیف شده، پنیر سفید فراپالایشی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لیپولیز

مقدمه

توسعه بافت و خواص حسی پنیر ایفا می‌کند. عوامل لیپولیتیک در پنیر عموماً از شیر، رنت، باکتری‌های لاکتیکی استارتتری (LAB)، باکتری‌های لاکتیکی غیراستارتتری (NSLAB)، میکروفلور ثانویه و افزودن لپازهای خارجی منشأ می‌گیرند که در این بین، باکتری‌های لاکتیکی استارتتری نقش کمی در لیپولیز داشته و تنها گونه لاکتوکوکوس لاکتیس دارای فعالیت لیپولیتیکی است و تولید مقادیر بیشتری از اسیدهای چرب آزاد توسط این گونه نیز مرهون تعداد بالای جمعیت سلولی یا دوره رسیدن طولانی می‌باشد (McSweeney and Sousa, 2000; Fox and Wallace, 1997). در پنیرهای UF با توجه به اعمال فرآیندهای حرارتی در دو مرحله پاستوریزاسیون و اولترا فیلتراسیون به شیر پنیرسازی و حضور بالای پروتئین‌های آب پنیر در فاز تغلیظ شده، به نظر می‌رسد از میزان فعالیت آنزیم‌های لپازی و استرازی شیر و باکتری‌های لاکتیکی استارتتری (LAB) کاسته شده و در نتیجه آزادسازی اسیدهای چرب و به دنبال آن بروز خصوصیات آرومایی و بافتی با شیب کندتری جلو می‌رود (Karami et al., 2009a; Saboya et al., 2001).

امروزه از انواع روش‌های تسریع رسیدن مانند آغازگرهای الحاقی تضعیف شده (Attenuated Adjunct Starters) با هدف ارتقاء و بهبود ویژگی‌های حسی و ارگانولپتیکی در پنیرهای مختلف استفاده می‌شود (Saboya et al., 2001). سویه‌هایی که بیشتر از همه و به طور متداول جهت تهیه کشت‌های الحاقی تضعیف شده مورد استفاده قرار گرفته‌اند شامل باکتری‌های لاکتیکی غیراستارتتری (NSLAB) به‌ویژه

پنیر از فرآورده‌های بسیار مهم شیر به شمار می‌رود که ارزش غذایی خاصی در تغذیه انسان دارد. از جمله نکات قابل توجه در مورد پنیر، به وجود آمدن خواص ارگانولپتیکی ویژه‌ای از نظر بافت و آروما در محصول در طی دوره رسیدن است که با خواص چشایی شیر کاملاً تفاوت دارد. در حال حاضر یکی از پرمصرف‌ترین پنیرهای سفید نمکی در ایران پنیر تولیدی به روش اولترا فیلتراسیون (Ultrafiltration) است، که از شیر پاستوریزه گاو که پنج بار تغلیظ شده است، تهیه می‌شود (Hesari et al., 2007). با وجود مزایای بسیار قابل توجه این پنیرها، به‌ویژه راندمان تولید بیش از ۲۰ درصد که توجیه‌گر موفقیت سیستم UF در زمینه تولید پنیر است، پنیرهای تولیدی به دلایلی از قبیل عدم فعالیت کافی استارت‌ترهای لاکتیکی و نیز به تعویق افتادن اتولیز سلولی استارت‌ترها که احتمالاً ناشی از قدرت بافری بالای (افزایش غلظت پروتئین و مواد معدنی در فاز تغلیظ شده) پنیرهای UF است، معمولاً از ویژگی‌های ارگانولپتیکی مطلوبی در مقایسه با پنیرهای سفید سنتی برخوردار نیستند و روند کلی رسیدن در آن‌ها با تأخیر زیادی همراه است (Hannon et al., 2006; Saboya et al., 2001).

لیپولیز یکی از واکنش‌های بیوشیمیایی اصلی در رسیدن پنیر محسوب می‌شود که با تولید اسیدهای چرب آزاد با زنجیر کوتاه و متوسط و نهایتاً ترکیبات دارای طعم از قبیل متیل‌کتون‌ها، لاکتون‌ها، الکل‌های ثانویه، آلدئیدها و استرها به همراه پروتئولیز و گلیکولیز وقوعش طی رسیدن پنیرها به ویژه پنیرهای سخت ایتالیایی و رگه آبی ضروری است و نقش مهمی را در

(2000) توانستند بالاکتوباسیلوس هلویتیکوس و لاکتوباسیلوس کازئی تضعیف شده به روش شوک حرارتی، پنیر چداری تهیه کنند که لیپولیز بالایی را بوسیله اندازه‌گیری کل اسیدهای چرب آزاد نشان می‌داد، همچنین ارزیابی حسی این پنیرها نشانگر کیفیت بافتی و ساختاری بهتر آنها بود. با این وجود، در حال حاضر اطلاعات جامعی از تأثیر کشت‌های الحاقی تضعیف شده بر میزان لیپولیز در پنیر UF در دسترس نیست.

هدف از اجرای این تحقیق مطالعه تأثیر لاکتوباسیلوس پلانناروم تضعیف شده به عنوان آغازگر الحاقی بر فرآیند لیپولیز در پنیر سفید UF از طریق اندازه‌گیری اندیس لیپولیزی، ترکیب درصد اسیدهای چرب و خصوصیات شیمیایی، میکروبی و حسی در طول دوره رسیدن بود.

مواد و روش‌ها

الف- آغازگر الحاقی تضعیف شده

لاکتوباسیلوس پلانناروم (PTCC 1058) مورد استفاده از کلکسیون فارچها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران تهیه شد و جهت فعال‌سازی در محیط کشت MRS برات (de Man, Rogosa, and Sharpe broth,) (Merck) کشت و به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس سلول‌های باکتری در یک فاز ثابت بعد از پاساژ سوم سانتریفوژ (g 4000x، ۳۰ دقیقه، ۴ درجه سلسیوس) برداشت گردید. در این مرحله از رسوب باکتری‌ها توسط سرم فیزیولوژی استریل، سوسپانسیون به میزان ۱۰ میلی‌لیتر تهیه شد و این سوسپانسیون برحسب تعداد

گونه‌های لاکتوباسیلوس می‌باشد، که به عنوان باکتری‌های پروبیوتیک تأثیرات مفیدی بر سلامتی دارند (Settanni and Moschetti, 2010) و همچنین بدلیل برخورداری از فعالیت بالای لیپولیتیکی از طریق آنزیم استراز و در نتیجه هیدرولیز اختصاصی اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (C_{2:0} - C_{8:0})، نقش ویژه‌ای را در رسیدن و بهبود طعم و بافت پنیر ایفا می‌کنند (Georgala et al., 2005; Collins et al., 2003). متداول‌ترین روش جهت تضعیف، استفاده از روش‌های فیزیکی شامل شوک حرارتی (Heat Shock) و شوک سرمایی (Freeze Shock) می‌باشد (Klein and Lortal, 1999). ترکیب صحیح دما- زمان در تضعیف آغازگرها با انواع روش‌ها از قبیل شوک حرارتی گونه‌های لاکتوباسیلوس از یک طرف با زنده‌ماندن درصد بالایی از سلول‌های باکتری همراه بوده و از طرف دیگر باعث افزایش اتولیز سلول‌های باکتری در کنار کاهش توانایی تولید اسید و ایجاد وقفه در فعالیت آنزیمی (پروتئاز و استراز داخل سلولی) به مدت چند ساعت خواهد شد، بدون اینکه در پتانسیل عملکردی آنها اختلالی ایجاد شود. با توجه به اینکه بیشتر آنزیم‌های باکتریایی مهم در رسیدن پنیر داخل سلولی هستند، جهت رهاسازی آنها و فعالیت آنزیمی باید سلول‌های باکتری اتولیز شود (Elsoda et al., 2000). بررسی اکثر مطالعات توسط Klein and Lortal (1999) نشان می‌دهد که افزایش پروتئولیز به همراه هیدرولیز چربی و رهاسازی اسیدهای چرب آزاد و در نهایت افزایش میزان عطر و طعم بدون تغییر در ترکیب شیمیایی پنیر، نتیجه استفاده از کشت‌های الحاقی تضعیف شده به روش شوک حرارتی (HS) در ساخت انواع پنیر می‌باشد. در تحقیقی Madkor و همکاران

کل باکتری‌های زنده موجود در آن ($10^9 \times 4$) به شیر بدون چربی استریل ۱۰ درصد اضافه گردید، سپس عمل تضعیف به روش شوک حرارتی با تجهیزات پاستوریزاسیون آزمایشگاهی انجام گرفت. جهت تضعیف گونه مزوفیل لاکتوباسیلوس پلانٹاروم دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه اعمال گردید و بلافاصله دما تا ۸ درجه سلسیوس کاهش داده شد (Asensio et al., 1996).

ب- روش تهیه پنیر

برای تهیه نمونه‌های پنیر UF، لیوان‌های مخصوص استریل با حجم ۴۰۰ گرم حاوی رتنتیت (Rtentate) پاستوریزه با فاکتور تغلیظ ۵ با دمای حدود ۳۵ درجه سلسیوس که بر روی آن استارتر اصلی به میزان ۵ درصد (وزنی/وزنی) اضافه شده بود، در شرایط کاملاً استریل از خط UF کارخانه شیر پاستوریزه پگاه آذربایجان شرقی گرفته شد. استارتر اصلی شامل مخلوطی از گونه‌های ترموفیل: استریپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکسی زیرگونه بولگاریکوس و مزوفیل: لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه کرموریس و لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه لاکتیس (FD-DVS FRC-65, Chr. Hansen's, Dairy) (Culture, Hoersholm, Denmark) لیوان‌های برداشت شده با توجه به نوع تیمار به ۲ سری تقسیم شدند: سری اول مربوط به گروه شاهد، بدون افزودن آغازگر الحاقی و سری دوم مربوط به گروه تیمار، با افزودن آغازگر الحاقی تضعیف شده لاکتوباسیلوس پلانٹاروم به میزان ۱ درصد تهیه شد. در نهایت با کاهش pH به ۶/۴ مایه پنیر از نوع قارچی (Rhizomucor miehei) با نام فروماز TL (DSM Food Specialities,)

(Seclin, France) به میزان ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم رتنتیت، به همراه ۱۰ ppm ماده ضد کف و ۱۵ ppm ماده ضد چسبندگی (Danapak, Denmark) به داخل لیوان‌ها اضافه گردید و به جهت تشکیل دلمه در تونل انعقاد با دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. با رسیدن لیوان‌ها به انتهای تونل و قرارگیری کاغذ مخصوص (Parchment) بر روی پنیرها و افزودن ۱۱-۸/۵ گرم نمک (وزنی/وزنی) بر روی آن‌ها، نهایتاً دربندی با فویل آلومینیومی صورت گرفت. پنیرها ابتدا در گرم‌خانه با دمای ۲۸-۲۶ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد و بعد از رسیدن pH پنیر به زیر ۴/۸ به سردخانه ۸ درجه سلسیوس منتقل و به مدت ۶۰ روز در این دما جهت انجام آزمون‌های مختلف نگهداری شدند. تهیه نمونه‌ها در سه روز متفاوت پنی‌سازی جهت اعمال سه تکرار انجام شد و خصوصیات شیمیایی، میکروبی و لیپولیز در نمونه‌های شاهد و تیمار به ترتیب در روزهای ۱، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ رسیدن مورد بررسی قرار گرفتند.

ج- آزمایش‌های شیمیایی، میکروبی و حسی

ویژگی‌های شیمیایی پنیرها شامل pH از طریق دستگاه pH متر کالیبره دیجیتال (Hanna Instruments, USA)، ماده خشک پنیر از طریق خشک کردن نمونه پنیر در آون با دمای 2 ± 102 درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت (IDF, 1982)، میزان چربی با استفاده از روش ژربر (IDF, 1997a) و نمک به روش ولهارد (James, 1995) اندازه‌گیری شدند.

جهت شمارش میکروبی ابتدا ۱۰ گرم از نمونه پنیر با ۹۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل از طریق همزن مغناطیسی به مدت ۲ دقیقه هم‌وزنیزه شد. سپس

می‌شود و به روش تیتراسیون با KOH اتانولی ۰/۱ نرمال در حضور معرف فنل فتالین در لایه چربی استخراج شده از پنیر مطابق روش Alizadeh و همکاران (2006) تعیین گردید.

پروپیل اسیدهای چرب: جهت استخراج اسیدهای چرب، ابتدا نمونه پنیر مورد آزمایش توسط دستگاه هموژنایزر به خوبی با حلال کلروفرم و متانول به نسبت ۱:۲ مخلوط شده، در نهایت فاز آلی مخلوط صاف شده فوق به کمک دستگاه سانتریفوژ جدا و آبگیری گردید (Folch, 1957). اسیدهای چرب موجود در نمونه‌های نگهداری شده، با استفاده از تری فلئوروبورن و سدیم هیدروکسید متانولی و طی یک واکنش استریفیکاسیون به صورت مشتقات متیل استر و فرار خود درآمده و در فاز کلروفرم متیله گردیدند (ISO 5509, 2000). پروپیل اسیدهای چرب با استفاده از دستگاه گازکروماتوگرافی با طیف سنج جرمی (GC/MS) تعیین گردید و درصد نسبی هرکدام از ترکیبات تشکیل دهنده با توجه به سطح زیر منحنی در طیف کروماتوگرام به دست آمد (ISO 5508, 2012). از دستگاه گازکروماتوگرافی (GC) مدل ۷۸۹۰ A (Agilent Technologies, USA) متصل به دکتور جرمی مدل ۵۹۷۵ C (Agilent Technologies, USA) استفاده شد. اسیدهای چرب C_{18:3} - C_{4:0} از طریق ستون مدل ۱۹۰۹۱S (Agilent Technologies, USA) به طول ۳۰ متر، قطر ۲۵۰ میکرومتر، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر جداسازی شدند. برنامه‌ریزی حرارتی ستون GC، از ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه تا ۲۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه با افزایش دمای ۳ درجه سلسیوس در هر دقیقه، دمای محفظه تزریق ۲۳۰ درجه سلسیوس با نسبت

لوله‌های سریال رقت با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل با حجم ۹ میلی‌لیتر تا رقت ۱۰^{-۹} تهیه گردید (IDF, 1996). برای شمارش کلی باکتری‌ها، نمونه‌های رقیق شده در محیط کشت پلیت کانت آگار (Plate count agar, Merck) به صورت مخلوط (Pour plate) کشت و در دمای ۱ ± ۳۱ درجه سلسیوس به مدت ۷۲-۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. جهت شمارش کلی لاکتوباسیل‌های مزوفیل از محیط کشت MRS آگار (De Man, Rogosa, and Sharpe agar, Merck, Germany) در شرایط بی‌هوازی و کشت به صورت مخلوط و گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲-۴۸ ساعت استفاده شد (Di Cagno et al., 2006).

برای بررسی خواص حسی پنیرهای تولیدی طی دوره رسیدن، یک گروه ۲۰ نفری پانلیست نیمه ماهر به روش هدونیک ۵ نقطه‌ای (یک = نامطلوب‌ترین و پنج = مطلوب‌ترین) پنیرها را از نقطه نظر ظاهری، بافتی، طعمی و پذیرش کلی، با درج رتبه‌ای بین ۱ تا ۵ در فرم مربوطه در دو فاصله زمانی ۱۵ و ۴۵ روزه مورد ارزیابی قرار دادند. برای این منظور قطعات پنیر به تکه‌هایی مناسب به وزن ۲۰ گرم برای گاز زدن بریده شد و پس از قرارگیری در داخل ظرف‌های پلاستیکی غیر قابل نفوذ به هوا که با اعداد تصادفی رمزگذاری شده بود، به مدت دو ساعت پیش از ارزیابی در دمای اتاق قرار داده شد. در هنگام آزمایش بیسکویت بدون نمک و آب در اختیار پانلیست‌ها قرار داشت (IDF, 1997b).

د- بررسی شدت لیپولیز در پنیر

اندیس اسیدیته (Acid Degree Value): عبارت است از مقدار کل اسیدهای چرب آزاد در پنیر که با واحد میلی‌اکی‌والان در ۱۰۰ گرم چربی (meq/100gr) بیان

شاهد پس از روز ۴۵ دوره رسیدن نشان داد در حالیکه شمارش لاکتوباسیل‌های مزوفیل در پنی‌رهای UF تیمار با یک روند افزایشی و کاهشی همراه بوده که اختلاف معنی‌داری ($p < 0/01$) را در مقایسه با پنی‌رهای UF شاهد همانند شمارش کلی از روز ۴۵ به بعد نمایان می‌کند (نمودار ۱). لیپولیز در هر دو نوع پنی‌ر UF در طول رسیدن افزایش یافته است (نمودار ۲). کمترین میزان لیپولیز مربوط به روز اول رسیدن پنی‌ر UF شاهد و بیشترین مقدار متعلق به روز ۶۰ رسیدن پنی‌ر UF حاوی آغازگر الحاقی تضعیف شده است و تفاوت بین نمونه‌های تیمار و شاهد در طول دوره رسیدن تفاوت معنی‌داری ($p < 0/01$) است. پروفیل اسیدهای چرب از $C_{4:0}$ تا $C_{18:3}$ استخراج شد (نمودار ۳). نتایج حاصل از یک طرف کاهش درصد اسیدهای چرب با زنجیر کوتاه و متوسط ($C_{4:0}$ - $C_{14:0}$) و از طرف دیگر افزایش درصد اسیدهای چرب با زنجیر بلند ($C_{16:0}$ - $C_{18:3}$) را در پنی‌ر UF حاوی آغازگر الحاقی تضعیف شده نسبت به پنی‌ر شاهد در روز سی‌ام رسیدن به صورت معنی‌دار ($p < 0/01$) نشان می‌دهد (جدول ۲). داده‌های مربوط به خواص حسی نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار ($p < 0/01$) آغازگر الحاقی تضعیف شده و روزهای رسیدن بر روی خواص حسی پنی‌رها است (جدول ۳).

تقسیم ۱ به ۱۰۰ و گاز حامل هلیوم با جریان ۳ میلی‌لیتر بر دقیقه بود.

ه- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از آزمایش‌ها بر اساس مدل فاکتوریل اسپلیت پلات در زمان با طرح بلوک‌های کامل تصادفی آنالیز شدند. کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گرفت و نتایج ارائه شده میانگین سه تکرار مستقل است. به منظور ارزیابی داده‌های حاصل از آزمایش‌ها از نرم‌افزار SAS[®] (1995) استفاده شد. به این ترتیب که برای تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح احتمال ۱ درصد و برای رسم جداول از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده شد.

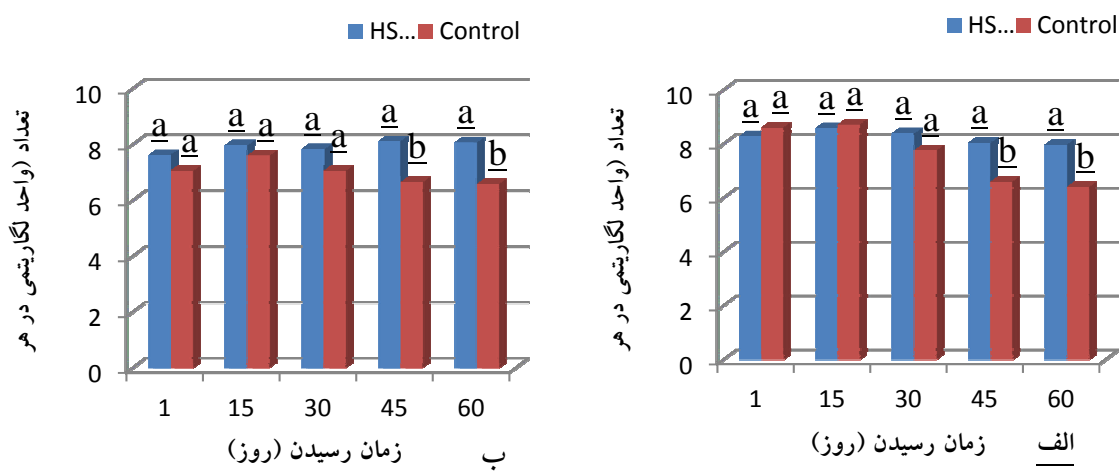
یافته‌ها

مطابق یافته‌های این پژوهش تغییرات میانگین مربوط به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی شامل درصد ماده خشک، چربی، نمک و pH بین پنی‌رهای UF حاوی لاکتوباسیلوس پلانٹاروم تضعیف شده و پنی‌رهای شاهد در طول ۶۰ روز دوره رسیدن اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند (جدول ۱). شمارش کلی باکتری‌ها یک کاهش معنی‌داری ($p < 0/01$) را بین نمونه‌های تیمار و

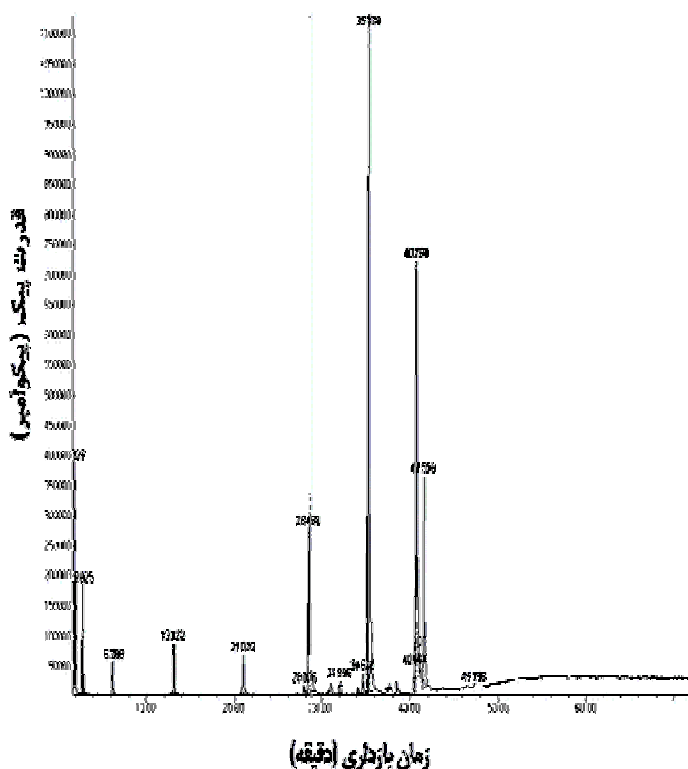
جدول ۱: میانگین تغییرات ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی پنیر UF ایرانی بر اساس نوع تیمار و زمان رسیدن

مدت زمان رسیدن (روز)					نمونه پنیر فرآپالایش	ویژگی شیمیایی
۶۰	۴۵	۳۰	۱۵	۱		
۳۸/۳۵ ^a	۳۸/۱۹ ^a	۳۸/۰۸ ^a	۳۷/۶۲ ^a	۳۷/۵۹ ^a	حاوی Lp تضعیف شده	ماده خشک (%)
۳۶/۶۳ ^a	۳۶/۳۸ ^a	۳۶/۸۷ ^a	۳۶/۵۱ ^a	۳۶/۱۲ ^a	شاهد	
۱۶/۹۰ ^a	۱۶/۹۳ ^a	۱۶/۸۰ ^a	۱۶/۹۰ ^a	۱۶/۷۳ ^a	حاوی Lp تضعیف شده	چربی (%)
۱۶/۸۳ ^a	۱۷/۱۰ ^a	۱۶/۹۳ ^a	۱۶/۸۳ ^a	۱۶/۵۰ ^a	شاهد	
۲/۷۵ ^a	۲/۵۴ ^a	۲/۳۷ ^a	۲/۰۹ ^a	۱/۸۲ ^a	حاوی Lp تضعیف شده	نمک (%)
۲/۸۸ ^a	۲/۷۲ ^a	۲/۳۸ ^a	۲/۱۴ ^a	۱/۹۷ ^a	شاهد	
۴/۴۷ ^a	۴/۵۴ ^a	۴/۵۵ ^a	۴/۶۵ ^a	۴/۷۹ ^a	حاوی Lp تضعیف شده	pH
۴/۵۰ ^a	۴/۵۶ ^a	۴/۵۵ ^a	۴/۶۳ ^a	۴/۶۴ ^a	شاهد	

حروف غیرمشابه در هر ستون (مربوط به یک ویژگی شیمیایی) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$).



نمودار ۱: میانگین شمارش کلی (الف) و شمارش لاکتوباسیلوس‌های مزوفیل (ب) در پنیر سفید UF بر اساس نوع تیمار و زمان رسیدن

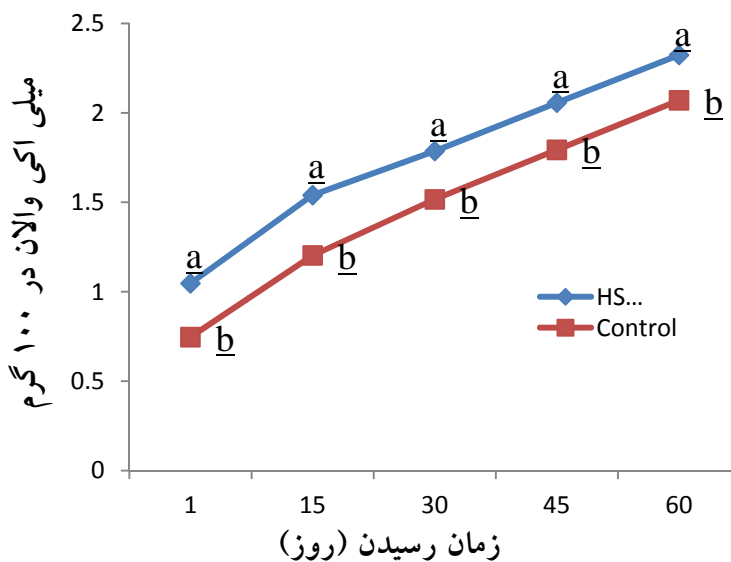


نمودار ۲: نمونه‌ای از کروماتوگرام اسیدهای چرب پنیرسفید UF شاهد در روز سی‌ام رسیدن به روش گاز کروماتوگرافی (GC)

جدول ۲: میانگین درصد اسیدهای چرب در دو نوع پنیرسفید UF مورد آزمایش در روز سی‌ام رسیدن

اسید چرب	نمونه پنیر فرآپالایش	
	حاوی Lp تضعیف شده	شاهد
بوتیریک (C4:0)	۳/۱۳ ^a	۵/۲۷ ^b
کاپروئیک (C6:0)	۲/۲۵ ^a	۳/۶۹ ^b
کاپریلیک (C8:0)	۱/۱۸ ^a	۲/۰۸ ^b
کاپریک (C10:0)	۲/۳۶ ^a	۴/۰۵ ^b
لوریک (C12:0)	۲/۲۵ ^a	۳/۸۹ ^b
میرستیک (C14:0)	۱۰/۳۳ ^a	۱۳/۴۶ ^b
پالمیتیک (C16:0)	۳۷/۶۷ ^a	۳۶/۰۵ ^b
استئاریک (C18:0)	۱۱/۹۲ ^a	۸/۴۹ ^b
اولئیک (C18:1)	۲۵/۴۵ ^a	۲۰/۰۳ ^b
لینولئیک (C18:2)	۱/۴۵ ^a	۱/۰۰ ^b
لینولنیک (C18:3)	۰/۳۱ ^a	۰/۱۴ ^b
اشباع (SFA)	۷۱/۰۹ ^a	۷۶/۹۸ ^b
تک غیر اشباع (MUFA)	۲۷/۰۰ ^a	۲۱/۷۶ ^b
چند غیر اشباع (PUFA)	۱/۷۶ ^a	۱/۱۴ ^b

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.01$).



نمودار ۳: میانگین تغییرات اندیس لیپولیز (ADV) در پنیرسفید UF بر اساس نوع تیمار و زمان رسیدن

حروف غیر مشابه بر روی خطوط (مربوط به یک زمان رسیدن) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.01$).

جدول ۳: مقایسه میانگین رتبه ویژگی‌های حسی دو نوع پنیر سفید UF در روزهای ۱۵ و ۴۵ دوره رسیدن

ویژگی حسی	نمونه پنیر فرآپالایش	مدت زمان رسیدن (روز)	
		۴۵	۱۵
ظاهری	حاوی Lp تضعیف شده	۴/۴۰ ^a	۴/۱۰ ^a
	شاهد	۳/۵۵ ^b	۴/۳۵ ^a
بافتی	حاوی Lp تضعیف شده	۴/۵۰ ^a	۴/۱۵ ^a
	شاهد	۳/۵۵ ^b	۴/۲۰ ^a
عطر و طعم	حاوی Lp تضعیف شده	۴/۶۲ ^a	۴/۳۲ ^a
	شاهد	۳/۶۲ ^b	۴/۳۴ ^a
پذیرش کلی	حاوی Lp تضعیف شده	۴/۴۰ ^a	۴/۳۰ ^a
	شاهد	۳/۳۰ ^b	۴/۳۰ ^a

حروف غیر مشابه در هر ستون (مربوط به یک ویژگی حسی) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.01$).

بحث و نتیجه‌گیری

توسط اسیدلاکتیک باکتری‌ها، تولید اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب در اثر پروتئولیز و لیپولیز می‌باشد (Fox et al., 2000). این نتایج مشابه نتایجی است که Asensio و همکاران (1996) در ساخت پنیر با شیر بز کم‌چرب و Abdel Baky و همکاران (1986) در تولید پنیر راس (Ras) با آغازگرهای لاکتوباسیلی تضعیف شده با حرارت به آن دست یافته‌اند.

شمارش کلی باکتری‌ها در هر دو نوع پنیر UF در ۳۰ روز اول رسیدن با یک روند افزایشی همراه بوده اما در ماه دوم سیر نزولی به خود گرفته است. کاهش در شمارش کلی باکتری‌ها در نمونه‌های تیمار و شاهد به ترتیب ۰/۵ و ۲ واحد لگاریتمی بود و نشان‌دهنده این است که لاکتوباسیلوس پلاننتاروم تضعیف شده بر روی جمعیت میکروبی پنیر UF تأثیر مهاری نداشته است. میانگین شمارش لاکتوباسیل‌های مزوفیل در نمونه‌های تیمار و شاهد به ترتیب در روز اول رسیدن ۷/۶۱ و ۷/۰۵ و در روز ۶۰ رسیدن ۸/۰۷ و ۶/۵۸ واحد

عطر و طعم یکی از مهمترین ویژگی‌های موثر در بازارپسندی و مقبولیت پنیر به شمار می‌رود. یکی از عوامل تأثیرگذار در این زمینه توانایی سرعت بخشی و دستکاری مثبت واکنش‌های بیوشیمیایی رسیدن در پنیر می‌باشد. تا کنون استفاده از کشت‌های الحاقی تضعیف شده به خصوص گونه‌های لاکتوباسیل که به عنوان باکتری پروبیوتیک محسوب شده و برای سلامتی انسان مفیداند، در اکثر موارد به طور موثری در پیشبرد فرآیندها نقش داشته و تغییرات مناسبی را در جهت کاهش مدت زمان رسیدن در انواع پنیر فراهم آورده‌اند (Klein and Lortal, 1999).

نتایج این مطالعه نشان داد افزودن لاکتوباسیلوس پلاننتاروم تضعیف شده بر روی فرآیند تولید و ترکیب شیمیایی پنیر تأثیری نداشته و داده‌ها در یک محدوده نرمال برای پنیر UF قرار دارند. کاهش pH طی دوره رسیدن عمدتاً ناشی از تخمیر لاکتوز به اسید لاکتیک

طبقه‌بندی پنیرها می‌توان از اندیس اسیدیته استفاده کرد و در این گروه‌بندی پنیر چدار با اندیس اسیدیته بالاتر از ۳ ($ADV > 3$) میلی‌اکی‌والان در ۱۰۰ گرم چربی در دسته پنیرهای تند شده (Rancid) قرار می‌گیرد. لازم به توضیح است، اندیس لیپولیزی بدست آمده از پنیر UF حاوی لاکتوباسیلوس پلانتراروم تضعیف شده در ۶۰ روز رسیدن با ۲/۳۲ میلی‌اکی‌والان در ۱۰۰ گرم چربی عدم تند شدگی را با توجه به تقسیم‌بندی بالا نشان داد. توجه به برخی از فاکتورهای مهم مانند نوع و کیفیت شیر، فرآیند حرارتی اعمال شده، استارترهای لاکتیکی بکار رفته، دمای نگهداری و لپازهای رنینی که در مقدار اسیدهای چرب موجود در پنیر موثرند (De Wit et al., 2005) و از آنجایی که شرایط تولید برای هر دو نوع پنیر آزمایشی ثابت بوده است، تفاوت مشاهده شده در میزان لیپولیز پنیرها را می‌توان به تفاوت سیستم استارتری بکار رفته در آنها نسبت داد. به نظر می‌رسد تضعیف لاکتوباسیلوس پلانتراروم با شوک حرارتی تأثیر مثبتی بر اتولیز سلول‌های باکتری در جهت آزادسازی آنزیم‌های داخل سلولی و افزایش فعالیت آنزیمی داشته است. Di Cagno و همکاران (2006) دلیل اصلی افزایش لیپولیز در پنیر نوع پکورینا (Pecorino) تولید شده با لاکتوباسیلوس پلانتراروم را به وجود آنزیم‌های لپاز و استراز در آن نسبت دادند. افزایش درصد لیپولیز با افزودن کشت الحاقی تضعیف شده توسط Ezzat and El-Shafei (1991) در تولید پنیر راس (Ras) با استفاده از لاکتوباسیلوس هلوتیکوس نیز گزارش شده است. مطابق یافته‌های این پژوهش کاهش بیشتر درصد اسیدهای چرب کوتاه و متوسط زنجیر در پنیرهای UF تیمار در مقایسه با گروه شاهد، به دلیل تأثیر مثبت

لگاریتمی بود. این نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار ($p < 0.01$) لاکتوباسیل‌های مزوفیل در انتهای دوره رسیدگی نسبت به ابتدای آن است. متابولیسم آهسته‌تر لاکتوباسیل‌ها و توانایی‌شان در تطابق با شرایط نامساعد محیطی (اسیدیته، فعالیت آبی پایین و نمک بالا) در مقایسه با سایر باکتری‌های لاکتیکی می‌تواند دلیل وجود این گروه باکتریایی در مقادیر بالا در انتهای دوره رسیدگی باشد (Arenas et al., 2004). Di Cagno و همکاران (2011) نتایج مشابهی را از شمارش لاکتوباسیل‌های مزوفیل در تولید پنیر کاشیوتا (Caciotta) با آغازگرهای الحاقی تضعیف شده بدست آوردند، بطوریکه در روز اول رسیدن ۶/۱ واحد لگاریتمی باکتری‌های لاکتیکی غیراستارتری شمارش شده بود اما در روز ۶۰ به دلیل افزایش دانسیته سلولی به ۷/۱ واحد لگاریتمی رسید. مشخص گردیده است زمانی که باکتری‌های لاکتیکی غیراستارتری (NSLAB) در پنیر به شمارش بالایی برسند، می‌توانند فعالیت لپازی و استرازی متوسطی از خود نشان داده و در فرآیند لیپولیز و تولید اسیدهای چرب آزاد مشارکت کنند (Di Cagno et al., 2006).

اندیس اسیدیته در پنیرهای UF ساخته شده با لاکتوباسیلوس پلانتراروم تضعیف شده در هر دو نیمه رسیدن با شتاب بیشتری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت، به طوری که درصد لیپولیز در نمونه‌های تیمار طی ماه اول ۵۵/۸۱ درصد و در نمونه شاهد ۴۴/۱۹ درصد بوده است. اندیس اسیدیته در نمونه‌های تیمار شاهد به ترتیب در روز ۶۰ رسیدن ۲/۳۲ و ۲/۰۷ میلی‌اکی‌والان در ۱۰۰ گرم چربی بود. Collins و همکاران (2003) گزارش کردند که امروزه جهت

چرب بوتیریک با ۲/۱۴ و میریستیک با ۳/۱۳ درصد کاهش بود. با توجه به نتایج Karami و همکاران (2009b) و این تحقیق می‌توان اظهار کرد که اسیدهای چرب میریستیک، پالمیتیک و اولئیک اصلی‌ترین اسیدهای چرب در پنیر UF هستند.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان‌دهنده این است که بالاترین رتبه ویژگی‌های حسی از نظر خواص ظاهری، بافتی، طعمی و پذیرش کلی مربوط به روز ۴۵ رسیدن پنیر با کشت الحاقی تضعیف شده می‌باشد. پنیرهای تیمار ثبات بیشتری در روند صعودی عطر و طعم طی رسیدن از خود نشان داده و به این ترتیب در روز ۴۵ رسیدن، بعلت عدم ایجاد طعم‌های نامطلوب و نیز یکنواخت شدن بافت بالاترین رتبه ارزیابی حسی را به خود اختصاص دادند. در روز ۱۵ رسیدن، امتیازات حاصل از ارزیابی حسی بین تیمارها و گروه شاهد اختلافات معنی‌داری را نشان نمی‌داد اما در ماه دوم افت محسوس خواص ارگانولپتیک پنیر UF شاهد، مربوط به بافت نامناسب و عطر و طعم ضعیف‌تر این نوع پنیر در مقایسه با نمونه تیمار کاملاً مشهود شد. در گزارش Madkor و همکاران (2000) آمده است که افزودن آغازگرهای الحاقی تضعیف شده از لاکتوباسیلوس‌ها با افزایش تجزیه چربی و آزادسازی اسیدهای چرب در کنار ترکیبات حاصل از فرآیند پروتئولیز و گلیکولیز در گسترش عطر و طعم و ارتقا کیفیت در پنیر چدار موثر بوده است. نتایج مشابهی توسط Abdel Baky و همکاران (1986) و Ezzat and El-Shafei (1991) در مورد بهبود خواص حسی در پنیر راس با لاکتوباسیلوس تضعیفی با حرارت گزارش شده است.

لاکتوباسیلوس پلانناروم تضعیف شده از طریق فعالیت استرازی و لیپازی و سرعت بخشیدن به روند لیپولیز با هیدرولیز اسیدهای چرب (C_{4:0}-C_{14:0}) بوده است که با تولید آروما در پنیر UF با طعم‌های مختلف ارتباط دارد. این نتایج مشابه نتایجی است که Karami و همکاران (2009b) در بررسی تغییرات پروفیل اسیدهای چرب پنیر UF فتا طی زمان رسانیدن به آن دست یافتند که نشان می‌داد با افزایش مدت رسانیدن، درصد اسیدهای چرب (C_{4:0}-C_{12:0}) به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) کاهش یافته در حالی که درصد اسیدهای چرب (C_{18:3}-C_{16:0}) در اثر تجمع این اسیدها یا کاهش اسیدهای چرب کوتاه و متوسط زنجیر افزایش می‌یابد که دلیل این کاهش معنی‌دار اسیدهای چرب (C_{4:0}-C_{12:0}) را تبدیل آنها به فرآورده‌های ثانویه عطری و طعمی بیان کردند. اسیدهای چرب آزاد کوتاه زنجیر (C_{4:0}-C_{8:0}) نقش اصلی را در ایجاد عطر و طعم به ویژه در پنیر فتا بر عهده دارند، در عوض اسیدهای چرب با زنجیر بلند نقش خیلی کمی در این رابطه خواهند داشت (Georgala et al., 2005). Collins و همکاران (2003) با بررسی مقالات متعدد گزارش کردند هیدرولیز اسیدهای چرب ۲ تا ۸ کربنه توسط آنزیم استراز و ۱۰ کربنه و بالاتر از آن توسط لیپاز به طور اختصاصی انجام می‌گیرد و اسید چرب آزاد می‌گردد، که هر یک از این اسیدهای چرب آزاد موجب ایجاد طعم‌های ویژه و ترکیبات پیش طعم‌زا می‌شوند. در تحقیق حاضر اسیدهای چرب (C_{4:0}-C_{8:0}) در روز سی رسیدن از ۱۱/۰۴ درصد در نمونه‌های شاهد به ۶/۵۶ درصد در نمونه‌های تیمار کاهش یافتند. بیشترین تغییر در درصد اسیدهای چرب کوتاه و متوسط زنجیر مربوط به اسید

اشباع می‌شود، در نتیجه با ارتقا خواص حسی، بازارپسندی محصول را افزایش می‌دهد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مدیریت و پرسنل پرتلاش کارخانه شیر پاستوریزه پگاه آذربایجان شرقی و آزمایشگاه دپاکو که در تهیه و تولید نمونه‌ها و انجام آزمایشات ما را یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

در مجموع می‌توان گفت لیپولیز و کیفیت ارگانولپتیکی پنیر UF می‌تواند با استفاده از لاکتوباسیلوس پلانٹاروم تضعیف شده با شوک حرارتی افزایش پیدا کند. به نظر می‌رسد تیمار حرارتی بر روند اتولیز سلولی باکتری تأثیر گذاشته و خروج آنزیم‌های داخل سلولی فعال در تخریب چربی را به داخل ماتریکس پنیر فراهم می‌کند و با این کار باعث کاهش بیشتر درصد اسیدهای چرب اشباع کوتاه و متوسط زنجیر نسبت به بلند زنجیر و غیر

منابع

- کرمی، مصطفی، احسانی، محمدرضا، ابراهیم‌زاده موسوی، محمدعلی، رضایی، کرامت‌الله و صفری محمد (۱۳۸۸). تأثیر مدت زمان رسانیدن بر پروفیل اسیدهای چرب، ریز ساختار و خواص حسی پنیر UF فتا، مجله مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۴۰، شماره ۱، صفحه: ۱۱۰-۱۰۱.
- Abdel Baky, A.A., El-Neshawy, A.A., Rabie, A.M. and Ashour, M.M. (1986). Heat-shocked lactobacilli for accelerating flavour development of Ras cheese. *Food Chemistry*, 21: 301-313.
- Alizadeh, M., Hamed, M. and Khosroshahi, A. (2006). Modeling of proteolysis and lipolysis in Iranian white brine cheese. *Food Chemistry*, 97: 294-301.
- Arenas, R., Gonzalez, L., Bernardo, A., Fresno, J. M. and Tornadizo, M. E. (2004). Microbiological and physico-chemical changes in Genestoso cheese, a Spanish acid curd variety, throughout ripening. *Food Control*, 15: 271-279.
- Asensio, C., Parra, L., Pelaez, C. and Gomez, R. (1996). Use of heat-shocked mesophilic lactic acid bacteria in low-fat goat's milk cheese making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2919-2923.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H. and Wilkinson, M.G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13: 841-866.
- De Wit, M., Osthoff, G., Viljoen, B.C. and Hugo, A. (2005). A comparative study of lipolysis and proteolysis in Cheddar cheese and yeast-inoculated Cheddar cheeses during ripening. *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 606-616.
- Di Cagno, R., Quinto, M., Corsetti, A., Minervini, F. and Gobbetti, M. (2006). Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *International Dairy Journal*, 16: 119-130.
- Di Cagno, R., De Pasquale, I., De Angelis, M., Buchin, S., Calasso, M., Fox, P.F. and Gobbetti, M. (2011). Manufacture of Italian Caciotta-type cheeses with adjuncts and attenuated adjuncts of selected non-starter lactobacilli. *International Dairy Journal*, 21: 254-260.

- Elsoda, M., Madkor, S.A. and Tong, P.S. (2000). Adjunct cultures: Recent developments and potential significance to the cheese Industry. *Journal of Dairy Science*, 83: 609-619.
- Ezzat, N. and El-Shafei, H. (1991). Acceleration ripening of Ras cheese using freeze and heat-shocked *Lactobacillus Helveticas*. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 19: 347-358.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
- Fox, P.F. and Wallace, J.M. (1997). Formation of flavour compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology*, 45: 17-85.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. and McSweeney, P.L.H. (2000). *Fundamentals of cheese science*, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.
- Georgala, A., Moschopoulou, E., Aktypis, A., Massouras, T., Zoidou, E., Kandarakis, I. and Anifantakis, E. (2005). Evolution of lipolysis during the ripening of traditional Feta cheese. *Food Chemistry*, 93: 73-80.
- Hannon, J.A., Deutsch, S.M., Madec, M.N., Gassi, J.Y., Chapot-Chartier, M.P. and Lortal, S. (2006). Lysis of starters in UF cheeses: Behaviour of mesophilic lactococci and thermophilic lactobacilli. *International Dairy Journal*, 16: 324-334.
- Hesari, J., Ehsani, M.R., Mosavi, M.A.E. and McSweeney, P.L.H. (2007). Proteolysis in ultra-filtered and conventional Iranian white cheese during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 60(3): 211-220.
- IDF. (1982). Cheese and processed cheese. Determination of the total solids content. IDF standard 4A. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF. (1996). Preparations of samples and Dilutions for Microbiological Examination. IDF standard 122C. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF. (1997a). Milk and processed products. Determination of fat content. IDF standard 152A. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF. (1997b). Method for sensory evaluation of cheese. IDF standard 99C. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- ISO. (2000). International standards animal and vegetable fats and oils-Preparation of methyl esters of fatty acids. Method ISO 5509. International Organization for Standardization.
- ISO. (2012). International standards animal and vegetable fats and oils-analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids. Method ISO 5508. International Organization for Standardization.
- James, C.S. (1995). *Analytical chemistry of foods*. 1st ed. Chapman and Hall, Glasgow, UK.
- Karami, M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Rezaei, K. and Safari, M. (2009a). Micro structural properties of fat during the accelerated ripening of ultra filtered-Feta cheese. *Food Chemistry*, 113: 424-434.
- Karami, M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Rezaei, K. and Safari, M. (2009b). Influence ripen time on the fatty acid profile, microstructure and sensory properties of UF Feta Cheese. *Iranian Journal of Biosystems Engineering*, 40(1): 101-110. [In Farsi]
- Klein, N. and Lortal, S. (1999). Attenuated starters: an efficient means to influence cheese ripening – a review. *International Dairy Journal*, 9: 751-762.
- Madkor, S.A., Tong, P.S. and El Soda, M. (2000). Ripening of cheddar cheese with added attenuated adjunct of lactobacilli. *Journal of Dairy Science*, 82: 1684-1691.
- McSweeney, P.L.H. and Sousa, M.J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80: 293-324.
- Saboya, L.V., Goudedranche, H., Maubois, J.L., Lerayer, A.L.S. and Lortal, S. (2001). Impact of broken cells of lactococci or propionibacteria on the ripening of sant-paulin UF cheese: extent of proteolysis and GC-MS profiles. *Lait*, 81: 699-713.
- SAS®. (1995). *User's Guide: Statistics, Version 9.1st Edition*. Cary, NC, USA: SAS Institute.
- Settanni, L. and Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27: 691-697.