JRIFST

مقالۀ کامل پژوهشی

https://journals.rifst.ac.ir
ISSN: 2252-0937(print), 2538-2357(online)
پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال 1402، جلد 12، شماره 1، صفحات 76-55
https://doi.org/10.22101/JRIFST.2022.347104.1374

مطالعۀ تأثیر رنگدانۀ فیکوسیانین بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، حسی، میکروبی و آنتی‌اکسیدانی پنیر

نیکان ایری[1]، بهاره نوروزی[1*]، شکوفه غازی[2]

1- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نویسندۀ مسئول (bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir)

2- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

رنگدانۀ فیکوسیانین مستخرج از سیانوباکتری *اسپیرولینا پلاتنسیس* به‌دلیل خواص منحصربه‌فرد، می‌تواند نقش مهمی در غنی‌سازی پنیرهای سنتی داشته باشد. در این مطالعه میزان پروتئین، چربی، خاکستر، رطوبت، بتا-کاروتن و pH پنیر غنی‌شده با غلظت‌های متفاوت رنگدانۀ فیکوسیانین تعیین شد. علاوه‌برآن شمارش باکتری‌ها به‌همراه ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی انجام گردید. همچنین آزمایش کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) جهت شناسایی ترکیبات فرار طی روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 انجام گردید. نتایج حاصل از آزمایش‌ها نشان داد که میزان چربی، رطوبت، pH و 1و1-دی‌فنیل-2-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) پنیرهای غنی‌شده کاهش معنی‌داری نسبت به نمونۀ شاهد داشته است. همچنین میزان پروتئین، بتا-کاروتن، قدرت سنجش کاهش آهن (FRAP) و به‌دام‌اندازی نیتریک اکسید افزایش معنی‌داری نسبت به نمونۀ شاهد داشته است. ارزیابی حسی نیز افزایش معنی‌داری از رضایت را به‌جزء حس بویایی نسبت به نمونۀ شاهد نشان داد. علاوه‌برآن، *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* طی روزهای مختلف یافت نگردید. بااین‌حال، حضور باکتری *کلی‌فرم* از روزهای 7 تا 21 در پنیرهای غنی‌شده و نمونۀ شاهد مشهود بود. همچنین نتایج ترکیبات فرار حاصل از آزمایش GC-MS در نمونۀ شاهد و پنیر غنی‌شده با 1 درصد رنگدانۀ فیکوسیانین نشان از حضور ترکیباتی با خاصیت ضدمیکروبی می‌باشد که نقش مهمی در ماندگاری و کیفیت پنیر دارد. امید است نتایج حاصل از این مطالعه، زمینه‌ساز توانمندسازی صنایع غذایی در استفاده از زنگدانه‌های حاصل از سیانوباکتری‌ها باشد.

تاریخ دریافت: 1401/03/26
تاریخ بازنگری: 1401/05/25
تاریخ دریافت: 1401/06/11
تاریخ انتشار برخط: 1401/06/12

واژه‌های کلیدی
رنگدانۀ فیکوسیانین
فعالیت آنتی‌اکسیدانی
بار میکروبی
ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی
ارزیابی حسی

OPEN ACCESS
CC BY

مقدمه

امروزه سلامت و کیفیت در صنایع غذایی از نقش و جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. بهینه‌سازی و بهبود ارزش غذایی فراورده‌های غذایی بسیار با اهمیت می‌باشد. لذا نتایج مطالعههایی که منجربه ارتقای کیفیت و ارزش غذایی شود، مفید خواهد بود. باتوجه‌به افزایش جمعیت و دغدغۀ تأمین مواد غذایی مصرفی جامعه، نوآوری تولید انواع پنیر که مصارف عموم مردم را داراست قادر به رفع نیازهای مصرفی آنها خواهد بود. پنیر فراورده‌ای است که به اشکال نرم، نیمه‌سخت، سخت و خیلی سخت به بازار عرضه می‌شود و در آن نسبت پروتئین سرم به کازئین از نسبتی که در شیر است، نباید تجاوز کند (Iran National Standards Organization, 2002a). برخی از ارزش‌های غذایی و درمانی پنیر شامل: جلوگیری از پوکی استخوان (Miller, 2017)، تأثیر مثبت روی سلامت دندان‌ها (Academy of General Dentistry, 2013)، افزایش وزن به روش سالم (Staughton, 2020).

بهترین منبع غذایی برای کلسیم (Miller, 2017)، منبع مناسب برای ویتامین B_{12} (Busch, 2018) می‌تواند باعث کاهش فشارخون گردد (Miller, 2017) و فراهم‌کنندۀ چربی ضروری که دارای فعالیت‌های ضدسرطانی، ضددیابتی، ضدموتاسیون، ضدچاقی، پیشگیری‌کننده از سختی مفاصل، ضدفشارخون و افزایندۀ فعالیت ایمنی می‌باشد (Koba & Yanagita, 2014; Nagao & Yanagita, 2005; Pariza *et al.*, 2001). باتوجه‌به اینکه پنیر یکی از مواد غذایی اصلی مورد‌مصرف در کشور است، عدم رعایت شرایط مناسب و استاندارد در مراحل تهیه، تولید، نگهداری و عرضۀ پنیر سنتی باعث انتقال میکروارگانیسم‌ها بخصوص باکتری‌های بیماری‌زا به این فراورده می‌شود. ازجملۀ این باکتری‌ها می‌توان به *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *کلی‌فرم* اشاره کرد (Rezaei *et al.*, 2014). در سال‌های اخیر، توجه بیشتری به رنگدانه‌های طبیعی و غذاهای غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها شده است که با کاهش خطرهای بی‌شمار ناشی از بیماری‌های مزمن در انسان مربوط می‌باشد (Li *et al.*, 2012). ازاین‌رو، جستجو برای متابولیت‌های دارای خواص آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدان با منشأ طبیعی از اهمیت خاصی برخوردار است. در این میان سیانوباکتری‌ها گروه بسیار متنوعی از ارگانیسم‌های پروکاریوتی[1] هستند که تقریبا در هر اکوسیستمی قادر به رشد می‌باشند. برخلاف پروکاریوت‌های دیگر (باکتری‌ها و آرکی[2]‌ها)، آنها فتوسنتز اکسیژنی را انجام می‌دهند و دارای کلروفیل a هستند (Choki *et al.*, 2021). *اسپیرولینا* یکی از جنس‌های شاخۀ سیانوباکتری‌هاست که طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کند (Nowruzi *et al.*, 2020). متابولیت‌های ثانویۀ سیانوباکتری با روش‌های مختلفی، بویژه توسط سیستم‌های پپتید سنتتاز غیرریبوزومی بیوسنتز می‌شود و طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی ازجمله فعالیت‌های مهارکنندۀ ضدسرطان، ضدباکتری، ضدویروس (Jafari Porzani *et al.*, 2022) و ضدپروتئاز (Li *et al.*, 2012) را نشان می‌دهد (Nowruzi *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2011). از دیگر ترکیبات بیواکتیو موجود در *اسپیرولینا* می‌توان به اسیدهای آمینۀ ضروری، ویتامین‌ها بخصوص B_{12}، نمک‌های معدنی، رنگدانه‌ها (کاروتنوئیدها، فیکوسیانین‌ها و کلروفیل‌ها)، اسیدهای چرب اشباع‌نشده ازجمله اسیدهای چرب امگا-3 و سایر ترکیبات بیولوژیکی فعال و در بین مواد مغذی می‌توان به آهن، منگنز، روی و مس اشاره کرد. رنگدانۀ طبیعی آبی‌رنگ فیکوسیانین، بیلی‌پروتئین عمدۀ *اسپیرولیناست* که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و تخریب رادیکال‌های آزاد (Sinanoglu *et al.*, 2012)، تقویت‌کنندۀ سیستم ایمنی، ضدسرطان، ضدویروسی، ضدحساسیت، محافظت‌کنندۀ کبد و کاهندۀ چربی خون می‌باشد (Yan *et al.*, 2014). از رنگدانۀ طبیعی آبی‌رنگ فیکوسیانین در غذاها، مواد آرایشی، آدامس، نوشیدنی‌ها و آبنبات استفاده می‌شود (Ansarifard *et al.*, 2018). همچنین این رنگدانه قابلیت استفاده به‌عنوان منبع غنی از پروتئین و ویتامین را دارا می‌باشد، لذا امکان استفاده در برنامۀ غذایی کودکانی که از سوءتِغذیه رنج می‌برند، فراهم نماید. در واقع افزودن 10 گرم رنگدانۀ فیکوسیانین زمینۀ رفع سوءتغذیه در نوزادان را فراهم خواهد نمود (Priyanka *et al.*, 2013). همچنین *اسپیرولینا* به‌دلیل داشتن منابع و ذخایر غنی از مواد مغذی، اسید چرب ضروری، اسیدآمینۀ ضروری، مواد معدنی، کاروتنوئیدها و ویتامین‌ها سهولت دسترسی به یک غذای ایده‌آل را برای فضانوردان مهیا خواهد نمود (Pandey & Tiwari, 2010; Priyanka *et al.*, 2013). به‌همین‌دلیل غنی‌سازی مواد غذایی تخمیرشده (پنیر، ماست، توفو (پنیر سویا)، سوپ، سس، پاستا و نوشیدنی‌ها) با رنگدانۀ فیکوسیانین می‌تواند در ارتقای بار میکروبی و همچنین افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها نقش به‌سزایی داشته باشد (Vonshak, 1990). از دیدگاه صنایع غذایی، استفاده از رنگدانۀ مجاز خوراکی برای ایجاد فراورده‌های جدید و بهبود کالا امری ضروری است. صنعت غذا، طی سالیان متمادی به‌منظور بهبود ویژگی‌های موردنظر مصرف‌کننده از انواع مختلف افزودنی، نظیر رنگدانه‌های مصنوعی، استفاده می‌کند که متأسفانه برخی از این مواد به شدت برای سلامتی انسان مضر هستند (Selvam *et al.*, 1995).

ازآنجایی‌که انواع پنیرها ممکن است قسمت عمده‌ای از رژیم غذایی بخصوص برای کودکان باشد، تولید محصولی غنی از مواد غذایی ضروری بدن می‌تواند زمینه‌ساز کاربردی‌شدن استفاده از رنگدانۀ خوراکی فیکوسیانین برای افزایش کیفیت مواد غذایی باشد که نه تنها نوآورانه است، بلکه از لحاظ اقتصادی نیز بسیار مقرون‌به‌صرفه می‌باشد. ازطرف‌دیگر، ازآنجایی‌که تاکنون تحقیقی درمورد استخراج، جداسازی و خالص‌سازی و همچنین ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خواص ضدمیکروبی رنگدانۀ فیکوسیانین و تأثیر آن بر پنیرهای سنتی در ایران انجام نگرفته است، هدف

[1] Prokaryote
[2] Archaea

از مطالعهٔ حاضر استفاده از رنگدانهٔ طبیعی فیکوسیانین جهت غنی‌سازی پنیر و افزایش فاکتورهای مغذی پنیر و مقایسهٔ فاکتورهای مغذی پنیر غنی‌شده با پنیر کنترل می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند زمینه‌ساز معرفی رنگدانه‌های طبیعی خوراکی از سیانوباکتری‌ها با قابلیت استفاده در صنایع غذایی و افزایش ماندگاری محصولات لبنی از ایران تلقی گردد.

مواد و روش‌ها

مواد به‌کاررفته در این مطالعه، محیط‌کشت مایع زاروک، شیر پاستوریزه (شرکت میهن)، بافر فسفات (pH=7/2)، بافر سدیم فسفات، اسید استیک، قرص رنت، معرف 2و4و6-تریپیریدیل-اس-تریازین (TPTZ[1])، معرف گریس 1 و 2، معرف 1و1-دی‌فنیل-2-پیکریل‌هیدرازیل[2] (DPPH)، کاتالیزور (سولفات مس، سولفات سدیم)، اسید سولفوریک، استن 85 درصد، متانول، اسید کلریک، معرف مونوواناداات، معرف پریودات سدیم، معرف آمین هیدروکلراید، معرف فنانترولین، استاندارد سولفات منگنز، استاندارد فروآمونیوم سولفات، کلروپتاسیم و محلول نیتروپروساید 10 میلی مولار و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک (ساخت آلمان) می‌باشد.

کشت سیانوباکتری *اسپیرولینا* و استخراج رنگدانهٔ فیکوسیانین

سیانوباکتری *اسپیرولینا* در محیط‌کشت مایع زاروک در اتاقک رشد با دمای 2±28 درجهٔ سانتی‌گراد و روشنایی ممتد فلورسنت T12 با شدت 300 میکروانشتین در مترمربع در ثانیه برای 30 روز کشت شد. به‌منظور عصاره‌گیری 500 میلی‌لیتر از محیط‌کشت 14 روزه در 4000 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ و رسوب حاصله با بافر فسفات (pH=7/2) شست‌وشو و لیوفیلیزه شد. 2 گرم از بیومس خشک انجمادشده با دستگاه خشک‌کن انجمادی (Cosmos 20k، ساخت فرانسه) در 500 میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات (pH=7/2، 0/1 مولار) معلق شد. رنگدانهٔ فیکوسیانین با تکرار روش فریزکردن در 20- درجهٔ سانتی‌گراد و دوباره ذوب‌کردن در دمای اتاق (23 درجهٔ سانتی‌گراد) و تاریکی (4 ساعت) استخراج شد. مخلوط حاصله در 10000 دور در دقیقه به مدت 30 دقیقه در دمای 0±5 درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و محتوای فیکوسیانین جمع‌آوری و سپس فریزدرای گردید (Mishra *et al.*, 2010).

تهیهٔ پنیر

برای تهیهٔ پنیر، شیر تازه به میزان 1 لیتر در دمای 73 تا 75 درجهٔ سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه (پاستوریزاسیون) گرم شد و بعد از رسیدن به دمای 35 تا 40 درجهٔ سانتی‌گراد، خنک شد، 5 میلی‌لیتر اسید استیک به‌ازای هر 1 لیتر شیر اضافه و برای 15 ثانیه هم‌زده شد. حدود 1 تا 4 قرص رنت در 1 میلی‌لیتر آب رقیق، به مخلوط شیر و اسید استیک اضافه شد. سپس شیر با رنت برای مدت 1 ساعت به‌منظور فرایند تخمیر، ترکیب شد و سپس شیر لخته و پنیر به‌راحتی از شیر جدا شد. بعد از 5 دقیقه، شیر تازهٔ گاوی تخمیرشده با استفاده از ظرف استیل ضدزنگ تخلیه شد و سپس برای تسریع تولید آب‌پنیر، آب داغ (30 میلی‌لیتر) به آن افزوده گردید و دوباره تخلیه شد. به‌این‌ترتیب شیر گاو تازه بعد از فرایند تخمیر و فشرده‌سازی طبق فرمول (200 گرم) وزن داشت. سپس (0/3 درصد) نمک و همچنین پودر رنگدانه با غلظت‌های مختلف (شاهد، 0/5، 1 و 1/5 درصد) اضافه شد. پنیر حاصل، پس از آن در دمای یخچال (4 درجهٔ سانتی‌گراد) تا زمان تلقیح رنگدانه، برای تجزیه‌وتحلیل بیشتر (شکل 1) نگهداری شد (Fadaei *et al.*, 2015).

تعیین محتوای پروتئین و چربی

تعیین محتوای پروتئینی طبق استاندارد شمارهٔ 13483 (Iran National Standards Organization, 2010) به روش کجلدال در سه مرحلهٔ هضم، تقطیر و تیتراسیون انجام شد و با استفاده از رابطهٔ (1) اندازه‌گیری گردید (AOAC, 1990). همچنین برای تعیین محتوای چربی طبق استاندارد شمارهٔ 17602 (Iran National Standards Organization, 2014) به روش وزن‌سنجی (آزمون مرجع) با استفاده از دستگاه سوکسله (مدل SOX406، ساخت چین) انجام شد و با استفاده از رابطهٔ (2) اندازه‌گیری گردید (Buhler *et al.*, 2020).

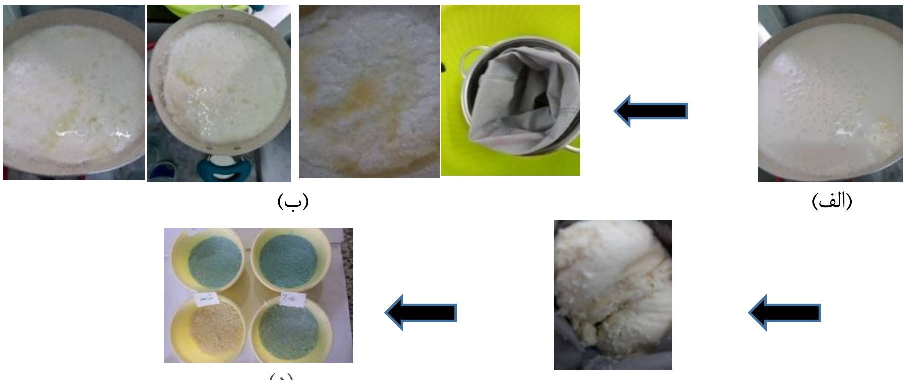
رابطهٔ (1)

$$\text{درصد پروتئین} = \text{درصد نیتروژن} \times 6/25$$

رابطهٔ (2)

$$\text{درصد چربی} = \frac{\text{وزن بالن با چربی} - \text{وزن بالن خالی}}{\text{وزن نمونهٔ خشک}}$$

---
[1] 2,4,6-Tripyridyl-S-Triazine
[2] 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl



شکل 1- فرایند تهیهٔ پنیر، الف) اضافه‌نمودن اسید استیک و قرص رنت به شیر، ب تا د) آب‌گیری بعد از لخته‌شدن شیر، هـ) تولید پنیر، و) افزودن رنگدانهٔ فیکوسیانین به پنیر در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد

تعیین محتوای رطوبت و خاکستر

تعیین محتوای رطوبت طبق استاندارد شمارهٔ 1753 (Iran National Standards Organization, 2002b) با استفاده از دستگاه آون (مدل 125، ساخت آلمان)، ترازو (مدل Kia tx200، ساخت چین) و دسیکاتور (TBT-10L، ساخت چین) انجام شد و با استفاده از رابطهٔ (3) اندازه‌گیری گردید. برای تعیین میزان خاکستر طبق استاندارد شمارهٔ 1755 (Iran National Standards Organization, 1977) انجام شد و با استفاده از رابطهٔ (4) اندازه‌گیری گردید.

رابطهٔ (3)

$$\text{درصد رطوبت} = \frac{\text{وزن پنیر خشک همراه پلیت} - \text{وزن پنیر مرطوب همراه پلیت}}{\text{وزن نمونهٔ اولیه}} \times 100$$

رابطهٔ (4)

$$\text{درصد خاکستر} = \frac{\text{وزن بوته چینی} - \text{وزن بوته چینی با نمونه}}{\text{وزن نمونه}} \times 100$$

تعیین غلظت بتاکاروتن

غلظت بتاکاروتن با تجزیه‌وتحلیل اسپکتروفتومتری (UV-Vis 1280، ساخت ژاپن) و با استفاده از سطوح جذب رنگ در طول موج 436 نانومتر اندازه‌گیری گردید. مقادیر حاصل برحسب میلی‌گرم بر گرم محاسبه شد.

اندازه‌گیری pH

تعیین pH طبق استاندارد شمارهٔ 2852 (Iran National Standards Organization, 2022) با استفاده از دستگاه pHمتر (مدل MetrohmT، ساخت سوئیس) انجام شد.

تکنیک کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) و کاربرد آن در شناسایی ترکیبات فرار پنیر

در این آزمایش از دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) (مدل QP2010 SE، ساخت ژاپن) مجهز به استخراج طبقهٔ فوقانی و حاوی ستون INNOWex-HP به طول 60 متر، ضخامت 0/5 میلی‌متر و قطر داخلی 0/25 میلی‌متر متصل به طیف‌سنجی جرمی و با پوشش پلی‌اتیلن گلیکول استفاده شد. باتوجه‌به اینکه نمونه‌های پنیر بافت متراکمی دارند و نمی‌توان در دستگاه GC-MS به‌طور مستقیم تزریق نمود، ابتدا برای عصاره‌گیری، نمونه‌ها را در داخل هاون با آب‌مقطر و حلال (3 متیل هپتانون) تا مرحلهٔ به‌دست‌آمدن محلول همگن، مخلوط شد و پس از سانتریفیوژکردن و برای به‌دست‌آوردن عصارهٔ شفاف؛ مایه رویی جمع‌آوری و به میزان 20 برابر رقیق شد. دمای اولیه 32 درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت 7 دقیقه نگه‌داشته شد و سپس دما از 6 تا 220 درجهٔ سانتی‌گراد در دقیقه افزایش یافت و به مدت 5 دقیقه در دمای 220 درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد، گاز حامل هلیوم در شرایط ثابت 1 میلی‌لیتر در دقیقه و به نسبت 1:30 در 200 درجهٔ سانتی‌گراد تزریق شد. مسیر انتقال (از GC-MS) در 220 درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد. عملیات آشکارسازی برحسب واحد جرم اتمی از 19تا 250 دالتون و یونیزاسیون الکترونیکی در 70 الکترون انجام شد. پس از ثبت و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، توسط رایانه Vectra XM 5.166PC نمایان شد (Izco & Torre, 2000).

آنالیزهای میکروبیولوژی

شمارش تعداد کل باکتری‌ها

جهت شناسایی تعداد کل باکتری‌ها طبق استاندارد شمارهٔ 5272 (Iran National Standards Organization, 2015) از روش کشت پورپلیت در محیط‌کشت پلیت کانت آگار[1] و انکوباسیون به مدت 48 ساعت و در دمای 37 درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد. بار میکروبی به‌صورت تعداد واحدهای تشکیل‌دهندهٔ کُلنی در هر گرم بیان شد.

[1] Plate Count Agar

شناسایی باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلی‌فرم*

جهت شناسایی *اشریشیاکلی* (گرم منفی) از روش Aygun و همکاران (2005) استفاده شد. 25 گرم از نمونه‌های پنیر در شرایط استریل توسط قاشقک درون ارلن مایر ریخته شد و به آن 225 میلی‌لیتر آب پپتونه اضافه شد. پس از مخلوط‌شدن به مدت 24 ساعت در انکوباتور (مدل BIN55) قرار داده شد. سپس 1 میلی‌لیتر از محیط‌کشت توسط پیپت استریل به محیط‌کشت اختصاصی ائوزین متیلن بلو (EMB[1]) اضافه شد. پس از 24 تا 48 ساعت انکوباسیون کُلنی‌های *اشریشیاکلی* نمایان شد. بار میکروبی به‌صورت تعداد واحدهای تشکیل‌دهندهٔ کلنی در هر گرم بیان شد (Aygun *et al.*, 2005). جهت شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* (گرم مثبت) با استفاده از محیط برد پارکر[2] و در 37 درجهٔ سانتی‌گراد انجام و بار میکروبی به‌صورت تعداد واحدهای تشکیل‌دهندهٔ کُلنی در هر گرم بیان شد (Jurkovic *et al.*, 2006). شناسایی باکتری *کلی‌فرم* با استفاده از محیط‌کشت ویولت رد بایل آگار[3] در دمای 37 درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد , بار میکروبی به‌صورت تعداد واحدهای تشکیل‌دهندهٔ کُلنی در هر گرم بیان شد (Duan *et al.*, 2008).

ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی به روش قدرت سنجش کاهش آهن (FRAP[4])

در این آزمایش طبق روش Benzie و Strain (1996) براساس کاهش آهن (Fe^{3+}) به آهن (Fe^{2+}) توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود در نمونه و از معرف 2و4و6-تریپیریدیل-اس-تریازین (TPTZ) انجام شد. ابتدا محلول FRAP تهیه شد، سپس 25 میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=3/6، 300 میلی‌مول بر لیتر) با 2/5 میلی‌لیتر معرف TPTZ (10 میلی‌مول بر لیتر) در اسید کلریک (40 میلی‌مول بر لیتر) همگن‌سازی شد و بعد از آن جذب نوری آن در 593 نانومتر توسط اسپکتروفتومتری خوانده شد. 20 میکرولیتر از نمونه‌های پنیر به 1 سی‌سی محلول فوق اضافه و دوباره تغییرات جذب در طول موج 593 نانومتر و در 37 درجهٔ سانتی‌گراد به مدت 4 دقیقه اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد 1و1-دی‌فنیل-2-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH)

این آزمایش براساس روش Ao و همکاران (2008) انجام شد. قبل از استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، کالیبراسیون انجام شد. ابتدا جذب نوری DPPH فاقد نمونه در طول موج 980 نانومتر خوانده شد و سپس 1 گرم از نمونهٔ پنیر درون فالکون حاوی 9 سی‌سی متانول اضافه شد و از دستگاه همزن جهت مخلوط‌کردن استفاده شد و سپس در دستگاه سانتریفیوژ در 4000 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه قرار گرفت و بعد از آن 25 میکرولیتر از عصارهٔ نمونه به 2 سی‌سی DPPH اضافه شد. تغییرات جذب در طول موج 517 نانومتر خوانده شد. نتایج به‌صورت IC_{50} برای تمامی نمونه‌ها طبق رابطهٔ (5) انجام شد (Ao *et al.*, 2008).

رابطهٔ (5)

$$\text{جذب نوری} = \frac{\text{جذب نمونه شاهد} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب نمونه شاهد}} \times 100$$

ارزیابی میزان به‌دام‌اندازی نیتریک اکسید

این روش بر این مبنا استوار است که سدیم نیتروپروساید در محلول‌های آبی و pH فیزیولوژیک با اکسیژن محیط وارد عمل شده و به آهستگی به نیتریک اکسید تبدیل می‌شود و یون نیتریت تولید می‌کند. یون نیتریت تولیدشده در حضور واکنش‌گر گریس موردسنجش قرار گرفت. در این روش از دو معرف گریس 1 (سولفانیل اسید/سولفانیل آمید) گریس 2 (ان(1-نفتیل) اتیلن دی‌آمین دی‌کلراید[5]) استفاده شد. ابتدا به 1 میلی‌لیتر از نمونه‌ها (نمونهٔ شاهد، 0/5، 1 و 1/5)، 1 میلی‌لیتر محلول سدیم نیتروپروساید 10 میلی‌مولار (سدیم نیتروپروساید در بافر فسفات با pH=7/10 تهیه شد) اضافه و سپس به نمونه‌ها، 0/5 میلی‌لیتر معرف گریس (1) اضافه گردید و از دستگاه اسپکتروفتومتر جهت اندازه‌گیری جذب نوری استفاده شد. نتایج جذب نوری معرف در سطح بالا به رنگ قرمز و در سطح پایین به رنگ صورتی نشان داده شد. تغییرات جذب نوری در طول موج 540 نانومتر اندازه‌گیری شد. براساس میکروگرم بر گرم در ساعت برای تمامی نمونه‌ها طبق رابطهٔ (6) انجام شد (Khalili & Ebrahimzadeh, 2015).

رابطهٔ (6)

$$\text{به‌دام‌اندازی نیتریک اساید} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب نمونه شاهد}}{\text{جذب نمونه شاهد}} \times 100$$

ارزیابی حسی

ارزیابی حسی پنیر براساس استاندارد شمارهٔ 4938 (Iran National Standards Organization, 1999) با استفاده از

[1] Eosin methylene blue (EMB)
[2] Baird- Parker
[3] Violet Red Bile Agar (VRBA)
[4] Ferric Reducing Assay Power
[5] Naphthylethylenediamine dihydrochloride

آزمون حسی به روش هدونیک 5 نقطه‌ای (خیلی بد=1 تا خیلی‌خوب=5) موردارزیابی قرار گرفت. آزمون توسط 10 نفر ارزیاب (خانم و آقای 25 ساله) آموزش‌دیده برای شاخص‌های طعم، بافت، بو، رنگ و پذیرش کلی انجام شد (Ghazi Zadeh & Razaghi, 1999).

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

آنالیزهای آماری داده‌های حاصل از هر آزمایش با نرم‌افزار SPSS (نسخهٔ 16) انجام شد. نتایج تمام داده‌ها در سه تکرار صورت گرفت. تفاوت معنی‌دار بین عوامل اندازه‌گیری‌شده با آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با حدود اطمینان 95 درصد و مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون توکی انجام گردید. نتایج مربوط به مقایسه‌ها به‌صورت نمودار با نرم‌افزار Microsoft Excel نسخهٔ 2003 نشان داده شده است.

نتایج و بحث

پنیر به‌دلیل داشتن ویژگی‌های حسی، ارزش غذایی، بافت، عطروطعم، ترکیبات فرار و غیره تقاضاکنندگان زیادی در سرتاسر جهان دارد. به‌دلیل داشتن این ویژگی‌ها، باکتری‌های پاتوژن در طول تولید پنیر باعث آلودگی آن می‌شوند (Jordan *et al.*, 2018; Kousta *et al.*, 2010). ازجمله باکتری‌های پاتوژن که باعث آلودگی محصولات غذایی بخصوص پنیر می‌شوند شامل *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس و کلی‌فرم* می‌باشند. احتمال آلودگی میکروبی پنیرهای سنتی باتوجه‌به شرایط تولید، نگهداری و فروش، بسیار زیاد است. باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* ازجمله باکتری‌های یافت‌شده در پنیرهای سنتی می‌باشند که منجربه بروز بسیاری از بیماری‌ها مانند اسهال، سندرم اورمی همولیتیک (HUS[1])، مسمومیت غذایی و عفونت‌های گوارشی در مصرف‌کنندگان می‌شوند.

آنالیزهای فیزیکوشیمیایی پنیر غنی‌شده

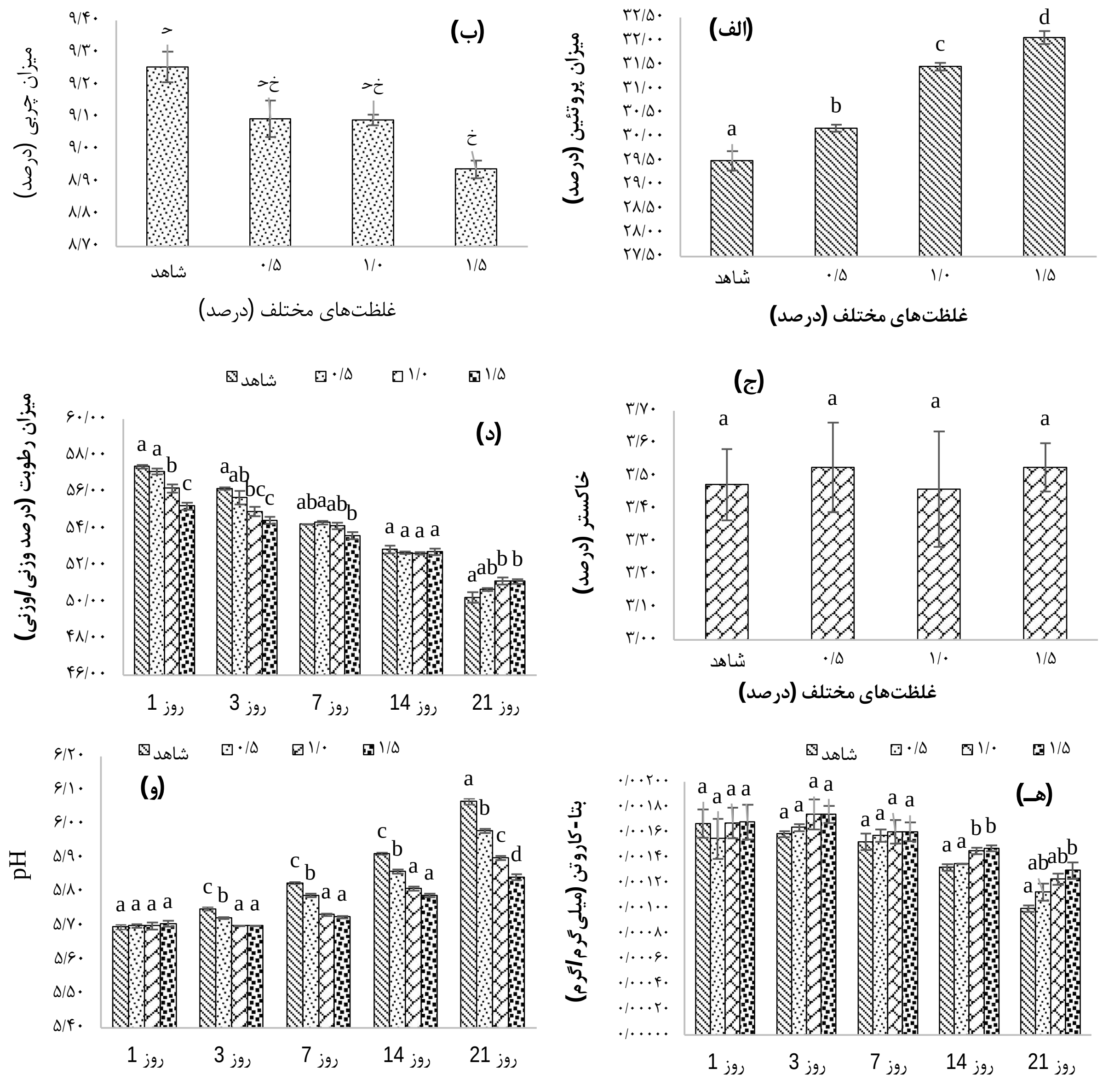
براساس نتایج شکل (2) میزان پروتئین پنیر غنی‌شده در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش داشته است (P<0/05)، به‌طوری‌که میزان پروتئین در غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد 0/92 برابر افزایش یافته است و همچنین ارزیابی میزان چربی پنیر غنی‌شده در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است (P<0/05) و میزان چربی در غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد 1/035 برابر کاهش یافته است. باتوجه‌به نتایج ارزیابی، میزان خاکستر پنیر غنی‌شده در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P<0/05). همچنین میزان رطوبت پنیر در روزهای 1، 3 و 7 در غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد به‌ترتیب 1/038، 1/031 و 1/011 برابر کاهش یافت، به‌طوری‌که میزان رطوبت نمونه با غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین در روز 21 نسبت به نمونهٔ شاهد 0/98 برابر افزایش یافت (شکل 2).

محتوای بالای پروتئین در انواع ریزجلبک، یکی از دلایل اصلی برای درنظرگرفتن آنها به‌عنوان منبع اصلی پروتئین است. پروتئین موجود در *اسپیرولینا* حاوی تمامی اسیدآمینه‌های ضروری والین، لوسین و ایزولوسین است و ازآنجاکه *اسپیرولینا* فاقد دیوارهٔ سلولی بوده، پروتئین موجود در آن قابلیت هضم بالایی دارد. در مطالعهٔ حاضر به‌طور معنی‌داری میزان پروتئین در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد افزایش داشته است (P<0/05)، به‌طوری‌که میزان پروتئین در غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد 0/92 برابر افزایش یافته است. مشابه نتایج، مطالعهٔ da Fontoura Prates و همکاران (2020) روی غلظت‌های 0/25، 0/5 و 1 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین بر پنیر به‌دست‌آمد. در مطالعهٔ Parada و همکاران (1998) و Beheshtipour و همکاران (2013) مرتبط با محتوای پروتئین نتایج مشابهی به‌دست‌آمد. Akalin و همکاران (2009) تأثیر زیست‌تودهٔ *اسپیرولینا* بر فعالیت میکروبیولوژی ماست‌های سنتی و پروبیوتیک‌ها در طول ذخیره‌سازی در یخچال را نشان دادند که میزان پروتئین نمونه‌های حاوی جلبک در مقایسه با نمونهٔ شاهد افزایش معنی‌داری داشت.

ریزجلبک‌ها حاوی مقادیر قابل‌توجهی چربی یا ترکیبی شبیه روغن‌نباتی هستند. در برخی شرایط خاص ریزجلبک‌ها تا 85 درصد وزن خشک خود، چربی دارند، اما

[1] Hemolytic Uremic Syndrom

معمولا مقدار چربی بین 20 تا 40 درصد وزن خشک می‌باشد. چربی ریزجلبک معمولا استر گلیسرول و اسیدهای چرب 14 تا 22 کربنی است. *اسپیرولینا* حاوی 5 تا 7 درصد لیپید می‌باشد به‌طورکلی اسید چرب ضروری از اسید لینولئیک و همچنین اسید گامالینولنیک تشکیل شده است (Ötleş & Pire, 2019). *اسپیرولینا* عاری از کلسترول بوده و غنی از اسیدچرب غیراشباع است که آن را جهت درمان و پیشگیری از تصلب شرائین، چاقی و فشارخون مناسب می‌سازد. باتوجه‌به اثرات مستقیم گامالینولنیک اسید روی سیستم ایمنی و درمان بسیاری از بیماری‌ها، ازاین‌رو همواره علاقهٔ زیادی به تولید بالا از گامالینولنیک اسید وجود داشته است (Sajilata *et al.*, 2008). در این مطالعه به‌طور معنی‌داری میزان چربی در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد کاهش داشته است (P<0/05)، به‌طوری‌که میزان چربی در غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد 1/035 برابر کاهش یافته است. اما در مطالعه‌های انجام‌شده توسط Bchir و همکاران (2018) نشان داد که با افزودن غلظت‌های مختلف رنگدانهٔ فیکوسیانین به پنیر تأثیری بر محتوای چربی محصول نداشته است



شکل 2 - ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی پنیر غنی‌شده با رنگدانهٔ فیکوسیانین، حروف‌های متفاوت روی تیرک‌ها نشان‌دهندهٔ اختلاف آماری معنی‌داری می‌باشد (P<0/05).

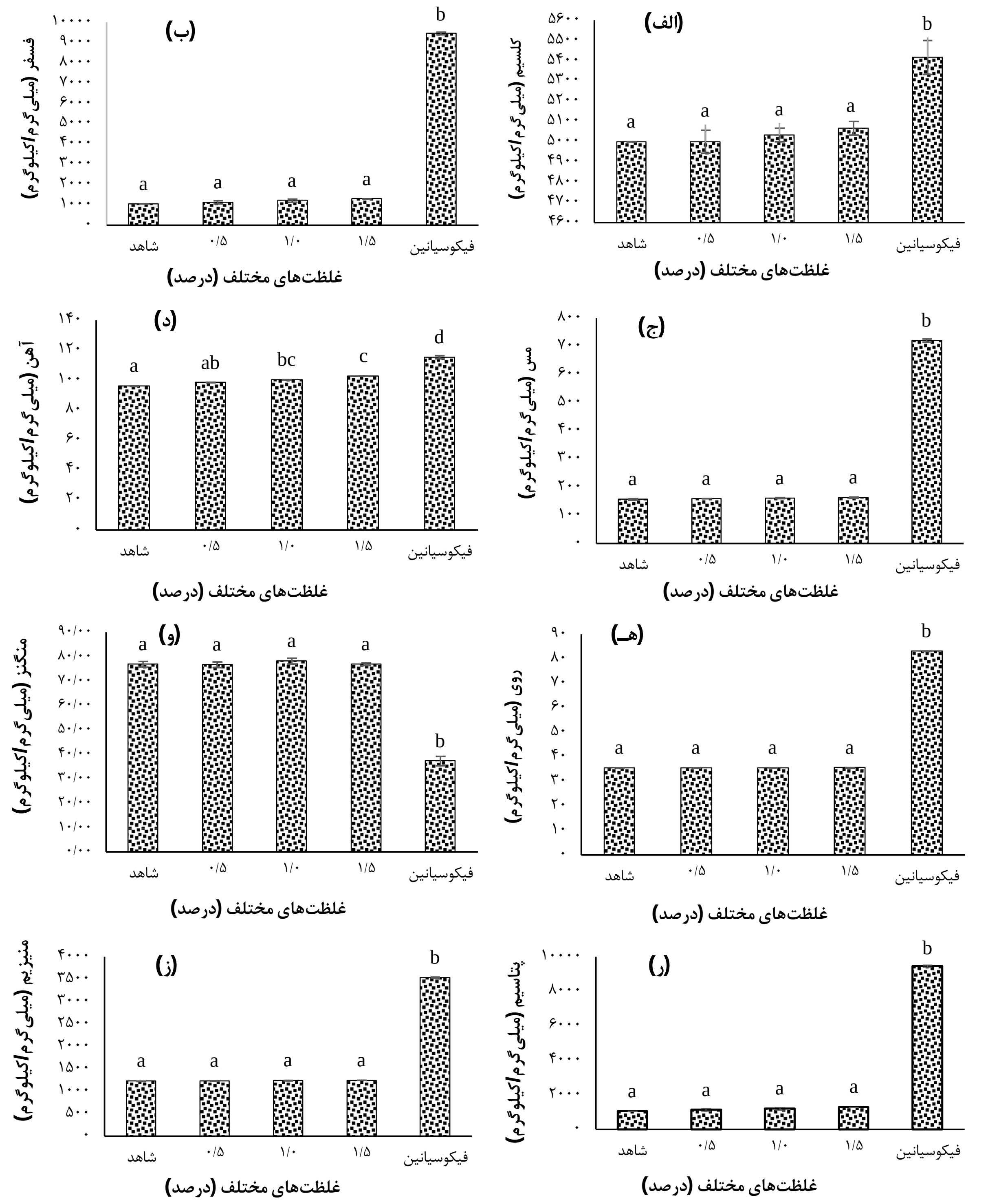
نتایج مطالعه‌های Terpou و همکاران (2021) نشان داد محتوای رطوبت اندازه‌گیری‌شده در پنیر غنی‌شده با *اسپیرولینا* تقریبا 2 درصد پایین‌تر از محتوای رطوبت در پنیرهای تجاری می‌باشد، این نتایج نشان می‌دهد با افزودن رنگدانهٔ فیکوسیانین *اسپیرولینا* به پنیر، آب اضافی پنیر نیز جذب می‌شود. محتوای رطوبت پنیر غنی‌شده با *اسپیرولینا* رطوبت کمتری نسبت به پنیر تجاری دارد (Terpou *et al.*, 2021).

مطالعهٔ Mardiani و همکاران (2013) نشان داد با افزایش غلظت‌های مختلف رنگدانهٔ فیکوسیانین باعث کاهش محتوای رطوبت پنیر می‌شود. همچنین مطالعهٔ Bosnea و همکاران (2021) تأثیر غلظت‌های 0/25، 0/5 و 1 گرم بر کیلوگرم پودر *اسپیرولینا* بر پنیر سنتی یونانی را نشان دادند که با افزایش غلظت *اسپیرولینا*، میزان رطوبت کاهش می‌یابد. مطالعه‌های انجام‌شده Mohamed و همکاران (2013) نشان دادند دلیل کاهش رطوبت با افزودن رنگدانهٔ فیکوسیانین به پنیر، مولکول‌های پروتئین ریزجلبک نیز می‌تواند نقش مهمی در فرایند جذب آب داشته باشد و باعث افزایش سفتی پنیر می‌شود. در مطالعهٔ حاضر میزان رطوبت روزهای 1، 3 و 7 در غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد به‌ترتیب 1/038، 1/031 و 1/011 برابر کاهش و در روز 21 در غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد 0/98 برابر افزایش یافت. Bensehaila و همکاران (2015) گزارش دادند *اسپیرولینا* شامل تمام مواد معدنی کلسیم، آهن، منیزیم، منگنز، فسفر، پتاسیم، سدیم و روی است. در مطالعهٔ حاضر میزان خاکستر در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد تفاوت معنی‌داری ندارد (P<0/05)، همچنین میزان کلسیم، منیزیم، مس، آهن، روی، منگنز، پتاسیم و فسفر در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد تفاوت معنی‌داری ندارند (P<0/05). اما در مطالعهٔ Puyfoulhoux و همکاران (2001) نشان دادند که میزان آهن در تمام غلظت‌های پنیر افزایش یافته است (P<0/05).

میزان غلظت بتاکاروتن پنیر غنی‌شده به‌طور معنی‌داری در روزهای 14 و 21 در غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد به‌ترتیب 0/89 و 0/76 برابر افزایش یافت. همچنین نتایج اندازه‌گیری pH در روز 1 تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد مشاهده نشد (P<0/05)، اما به‌طور معنی‌داری میزان pH در روزهای 3، 7، 14و 21 در غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد به‌ترتیب 1/01، 1/02، 1/02 و 1/04 برابر کاهش یافت (شکل 2). اندازه‌گیری مواد معدنی حاصل از خاکستر؛ شامل فسفر، پتاسیم، منگنز، روی، آهن، مس، منیزیم و کلسیم در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل 3).

در تحقیق Serlahwati و همکاران (2009) نشان دادند که بتا-کاروتن یک آنتی‌اکسیدان طبیعی است که رادیکال‌های آزاد را خنثی‌کرده و از بیماری جلوگیری می‌کند. براساس گزارش سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد (FAO)، مصرف 6 میلی‌گرم بتا-کاروتن در روز می‌تواند خطر ابتلابه سرطان را کاهش دهد. در مطالعهٔ حاضر به‌طور معنی‌داری میزان بتا-کاروتن روزهای 14 و 21 در غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد به‌ترتیب 0/89 و 0/76 برابر افزایش یافت. مشابه نتایج مطالعهٔ Agustini Winarni و همکاران (2016) با افزودن رنگدانهٔ فیکوسیانین به نمونه‌های پنیر به‌طور معنی‌داری میزان بتاکاروتن نسبت به نمونل شاهد افزایش یافت (P<0/05).

در مطالعهٔ حاضر تفاوت معنی‌داری در اندازه‌گیری pH در روز 1 در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد نداشت (P<0/05)، اما به‌طور معنی‌داری میزان pH در روزهای 1، 7، 14 و 21 غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد به‌ترتیب 1/01، 1/02، 1/02 و 1/04 برابر کاهش یافت. افزودن غلظت بالاتر رنگدانهٔ فیکوسیانین در طول زمان، منجربه‌افزایش فعالیت باکتری‌های موجود در پنیر و درنتیجه افزایش میزان تولید ترکیبات فرار اسیدی شد که خود منجربه‌کاهش pH و ماندگاری و کیفیت بهتر پنیر گردید. مشابه نتایج مطالعهٔ Fadaei و همکاران (2015) طی افزودن غلظت‌های مختلف رنگدانهٔ فیکوسیانین به نمونه‌ها، pH به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونهٔ شاهد کاهش پیدا کرد که مشابه نتایج مطالعهٔ Varga و همکاران (2002) می‌باشد.



شکل 3- ارزیابی مواد معدنی حاصل از خاکستر در پنیر غنی‌شده با رنگدانهٔ فیکوسیانین، حروف‌های متفاوت روی تیرک‌ها نشان‌دهندهٔ اختلاف آماری معنی‌داری می‌باشد (P<0/05).

ترکیبات فرار پنیر توسط GC-MS

باتوجه‌به نتایج جدول (1) ترکیبات فرار مشترک در پنیر نمونهٔ شاهد و پنیر غنی‌شده با 1 درصد غلظت رنگدانهٔ فیکوسیانین شامل 5-آلدهید، 10-استر، 4-کتون، 4-الکل، 6-اسید و 1-بنزن می‌باشد. استالدهید، بنزآلدهید، ترادکانال از گروه آلدهید، اتانول، 3-متیل-1-بوتانول، 2-فنیل اتانول از گروه الکل، 3-متیل بوتیل استر، 9-دکانوییک اتیل استر از گروه استر، 1و3-دی‌متیل بنزن از گروه بنزن، 4-اوکتن-3-اون و اوکتانوییک اسید، دکانوییک اسید، 2-دکانوییک اسید فراوانی بیشتری در نمونهٔ شاهد دارند. همچنین بیشترین درصد فراوانی در پنیر غنی‌شده با 1 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین در ترکیبات استالدهید از گروه

آلدهید، 2-پنتانون از گروه کتون، 3-متیل-1-بوتانول، اتانول، 2-فنیل اتانول از گروه الکل، بوتانوییک اسید اتیل استر، 3-متیل‌بوتیل استر، هگزانوییک اسید اتیل استر، دکانوییک اسید اتیل استر، 9-دکانوییک اتیل استر از گروه استر، 1و3-دی‌متیل بنزن از گروه بنزن، هگزانوییک اسید، اوکتانوییک اسید، دکانوییک اسید، 2-دکانوییک اسید از گروه اسید، 4-اوکتن-3-اون مشاهده شد. باتوجه‌به نتایج جدول (2) ترکیبات فراری که فقط در پنیر غنی‌شده با 1 درصد غلظت رنگدانۀ فیکوسیانین مشاهده شد شامل پنتان، هپتان، 2-پروپانون، 3-متیل بوتانال، آلفا-پینن، اپروپانول، بتا-پینن، بتا-میرسن، لیمونن، پروپانوییک اسید، اوکتانوییک اسید، پروپیل استر، 3-متیل بوتانوییک اسید و هپتانوییک اسید است و این ترکیبات در نمونۀ شاهد وجود نداشت. همچنین 2-پروپانون از گروه کتون، لیمونن از گروه ترپن و هپتانوییک اسید از گروه اسید فراوانی بیشتری داشتند. ترکیبات فرار موجود در اسانس‌های گیاهی نقش مهمی مانند آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و طعم‌دهندگی دارند به‌همین‌علت برای بهبود عملکرد و پایداری محصولات لبنی بخصوص پنیر به‌کار می‌رود (Ritota & Manzi, 2020).

جدول 1_ مقایسۀ ترکیبات فرار پنیر شاهد و غنی‌شده با 1 درصد رنگدانۀ فیکوسیانین مستخرج از GC-MS

ترکیبات	فرمول مولکولی	وزن مولکولی	زمان بازداری (دقیقه)	ماهیت ترکیبات	فراوانی (درصد) نمونۀ شاهد	فراوانی (درصد) 1 درصد غلظت رنگدانۀ فیکوسیانین
استالدهید	CH_3CHO	44/05	3/13	آلدهید	5/30	2/44
هگزانال	$C_6H_{12}O$	100/10	4/66	آلدهید	0/39	0/63
بوتانال	$C_4H_{10}O$	74/12	5/05	آلدهید	0/38	0/40
استیک اسید متیل استر	$C_3H_6O_2$	60/05	7/03	استر	0/36	0/70
استیک اسید اتیل استر	$C_4H_8O_2$	88/11	7/39	استر	0/58	0/98
2-بوتانون	C_4H_8O	72/11	8/35	کتون	0/45	0/37
2-پنتانون	$C_5H_{10}O$	86/13	8/85	کتون	0/57	1/22
اتانول	C_2H_5OH	46/07	9/2	الکل	1/93	1/63
پروپانوئیک اسید متیل استر	$C_3H_6O_2$	74/08	9/86	استر	0/16	0/26
پروپانوئیک اسید اتیل استر	$C_5H_{10}O_2$	116/11	10/02	استر	0/24	0/26
بوتانوئیک اسید اتیل استر	$C_4H_8O_2$	88/11	11/39	استر	0/22	1/09
استیک اسید-3-متیل‌بوتیل استر	$C_7H_{14}O_2$	130/18	13/35	استر	3/36	1/57
1-بوتانول	$C_4H_{10}O$	74/12	13/8	الکل	0/05	0/09
1و3-دی‌متیل بنزن	C_8H_{10}	106/16	14/68	بنزن	3/50	1/20
3-متیل-1-بوتانول	$C_5H_{12}O$	88/14	15/62	الکل	8/05	1/08
هگزانوئیک اسید اتیل استر	$C_8H_{16}O_2$	144/21	16/18	استر	0/38	1/34
3-هیدروکسی-2-بوتانون	$C_8H_{16}O_4$	176/22	17/25	کتون	0/14	0/43
2-دکانون	$C_{10}H_{20}O$	156/27	19/01	کتون	0/70	0/09
2و4-هگزا دی‌نال	C_6H_8O	96/13	19/50	هگزانال	0/12	0/10
اوکتانوئیک اسید اتیل استر	$C_{10}H_{20}O_2$	172/26	20/05	استر	0/24	0/78
استیک اسید	CH_3COOH	60/05	20/80	اسید	0/43	0/49
بنزآلدهید	C_7H_6O	106/13	22/82	آلدهید	3/22	0/27
بوتانوئیک اسید	C_3H_7COOH	88/10	23/88	اسید	0/55	0/87
دکانوئیک اسید اتیل استر	$C_{12}H_{24}O_2$	200/32	24/75	استر	0/14	2/41
هگزانوئیک اسید	$C_6H_{12}O_6$	116/16	27/3	اسید	0/23	1/96
ترادکانال	$C_6H_{28}O$	212/37	28/30	آلدهید	1/15	0/11
2-فنیل اتانول	$C_8H_{10}O$	122/16	28/44	الکل	2/27	1/82
4-اوکتن-3-اون	$C_8H_{14}O$	126/20	30/19	انون	13/69	7/43
اوکتانوئیک اسید	$C_8H_{16}O_2$	144/21	30/89	اسید	19/18	10/33
دکانوئیک اسید	$C_{10}H_{20}O_2$	172/26	33/26	اسید	10/10	24/63
9-دسنوئیک اسید اتیل استر	$C_{12}H_{22}O_2$	198/30	35/06	استر	1/17	1/35
دو دکانوئیک اسید	$C_{12}H_{24}O_2$	300/32	37/20	اسید	20/27	24/86

جدول 2- ترکیبات فرار پنیر غنی‌شده با 1 درصد غلظت رنگدانهٔ فیکوسیانین مستخرج از کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی (GC-MS)

ترکیبات	فرمول مولکولی	وزن مولکولی	زمان بازداری (دقیقه)	ماهیت ترکیبات	فراوانی (درصد)
پنتان	C_5H_{12}	72/15	4/15	آلکان	0/08
هپتان	C_7H_{16}	100/20	5/25	آلکان	0/18
2-پروپانون	C_3H_6O	58/80	6/86	کتون	1/75
3-متیل بوتانال	$C_5H_{10}O$	86/13	8/45	آلدهید	0/41
آلفا-پینن	$C_{10}H_{16}$	136/23	10/82	ترپن	0/27
1-پروپانول	C_3H_8O	60/09	12/25	الکل	0/15
بتا-پینن	$C_{10}H_{16}$	136/23	12/71	ترپن	0/24
بتا-میرسن	$C_{10}H_{16}$	136/23	13/21	ترپن	0/18
1-بوتانول	$C_4H_{10}O$	74/12	13/80	الکل	0/09
لیمونن	$C_{10}H_{16}$	136/24	15/15	ترپن	1/20
پروپانوئیک اسید	$C_3H_6O_2$	74/08	22/02	اسید	0/26
اوکتانوئیک اسید پروپیل استر	$C_{11}H_{22}O_2$	186/29	22/73	استر	0/20
3-متیل بوتانوئیک اسید	$C_5H_{10}O_2$	102/13	25/20	اسید	0/45
هپتانوئیک اسید	$C_7H_{14}O_2$	130/18	29/21	اسید	1/17

بررسی‌های انجام‌شده روی فعالیت اسانس‌های گیاهی در برابر فساد مواد غذایی و پاتوژن‌ها گزارش شده است به‌طورکلی اسانس‌ها به‌طور چشمگیری بر باکتری‌های گرم مثبت مؤثرتر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشند که علت آن احاطه‌شدن دیوارهٔ سلولی باکتری‌های گرم منفی با یک غشای خارجی است که موجب کاهش خروج ترکیبات هیدروفوبی در میان پوشش لیپوپلی‌ساکارید می‌شود (Burt, 2004; Burt, 2007; Smith-Palmer *et al.*, 2001).

Devi و Mehta (2016) خاصیت ضدمیکروبی ترکیبات فرار سیانوباکتری *نوستوک* را نشان دادند. از میان این ترکیبات فرار 2و6و10-تری متیل-14-اتیلن-14-پنتادکان و 1و2-بنزن دی کربوکسیلیک اسید دارای خاصیت ضدمیکروبی می‌باشند. اما در مطالعهٔ حاضر هیچ‌کدام از ترکیبات فرار فوق یافت نشد. بررسی‌های انجام‌شده توسط Alrubaie و همکاران (2021) روی خاصیت ضدمیکروبی عصارهٔ هگزان و متانول مستخرج از سیانوباکتری *اسپیرولینا پلاتنسیس* نشان داد که از میان ترکیبات فرار عصارهٔ هگزان، ترکیبات فرار هگزادکان، هپتادکان، اوکتادکان، 2-برومو پروپیونیک اسید، 2-بنزن دی کربوکسیلیک اسید، متیل-1-دوکوزن و تترادکانول خاصیت ضدمیکروبی بیشتری دارند. اما در مطالعهٔ حاضر یافت نشد. مطالعه‌های انجام‌شده توسط Halith و همکاران (2020) روی ریزجلبک‌های تحمل‌کنندهٔ نمک (*نوستوک*، *لینگبیا*، *فورمیدیوم*) نشان دادند، ترکیبات فرار دارای خاصیت ضدسرطانی، ضدالتهابی و ضدمیکروبی می‌باشد. در مطالعهٔ حاضر ترکیب فرار اکتانوئیک اسید در نمونهٔ شاهد و پنیر غنی‌شده با 1 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین یافت شد. Thillairajasekar و همکاران (2009) در تحقیقی که روی ریزجلبک *تریکودسمیوم اریترئوم* انجام دادند، دریافتند ترکیبات فرار عصارهٔ هگزان و اتیل‌استات شامل پالمیتیک اسید، اولئیک اسید، مریستیک اسید و بنزن استامید می‌باشد که خاصیت ضدمیکروبی دارند. اما در مطالعهٔ حاضر یافت نشد.

طبق مطالعهٔ Farghl و همکاران (2019) روی عصارهٔ اتانول مستخرج از *نوستوک کارنیوم* نشان دادند، ترکیبات فرار هگزادکانوئیک اسید متیل استر، فیتول استات، 9و12-اوکتادکادینوئیک اسید، متیل استر، 9و12و15-اوکتا دکا تریونیک اسید و متیل استر خاصیت ضدمیکروبی دارند و اما در مطالعهٔ حاضر یافت نشد. در مطالعهٔ Khairy و El-Kassas (2010) روی عصاره‌های اتیل‌استات، کلروفرم، متانول و دی‌اتیل اتر مستخرج از جلبک‌های سبز-آبی نشان دادند، عصارهٔ اتیل‌استات نسبت به دیگر عصاره‌ها خاصیت ضدمیکروبی بالاتری دارد، همچنین ترکیبات فرار عصارهٔ اتیل‌استات در جلبک *آنابنا فلوس آکوا*، هپتادکان و 7-متیل هپتادکان، جلبک *آنابنا واریابیلیس*، هگزا دکانوئیک اسید، اوکتا دکانوئیک اسید و تریکوزان، جلبک *اونوسماکوستیسیما* 5و7-دی ایزوپروپیل گزانتون-2-کربوکسیل و تریکوزان خاصیت ضدمیکروبی دارند. اما در مطالعهٔ حاضر مشاهده نشد. Ibrahim و همکاران (2019) روی پنیر غنی‌شده با اسانس نعناع مطالعه‌ای را انجام دادند و به‌این‌نتیجه رسیدند که منتول خاصیت ضداسپاسم،

ضدمیکروبی و ضدقارچ و لیمونن خاصیت ضدسرطان و ضدمیکروبی دارند. در مطالعهٔ حاضر ترکیبات فرار لیمونن، آلفا-پینن و بتا-میرسن فقط در پنیر غنی‌شده با 1 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین مشاهده شد. در تحقیق Licon و همکاران (2020) روی فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات فرار پنیر غنی‌شده با اسانس‌های گیاهی نشان داده شد ترکیبات فرار شامل آلفا-توجن، آلفا-پینن، کامفن، سابینن، بتا-پینن،آلفا-فلاندرن، آلفا-ترپینن، پی-سیمن، سیلوسترن، 1و8-سینئول، تا-اوسیمن، گاما-ترپینن، 4-توجانول، ترپینولن، لینالول، کامفور، برنئول، ترپینن-4-ال، آلفا-ترپینئول، 4-آلیل آنیزول، لینالیل استات، نرول، نرال، اوژنول، برنیل استات، نیریل استات و متیل اوژنول می‌باشند، که فعالیت ضدمیکروبی دارند. در مطالعهٔ حاضر ترکیبات فرار آلفا-پینن و بتا-پینن فقط در پنیر غنی‌شده با 1 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین مشاهده شد.

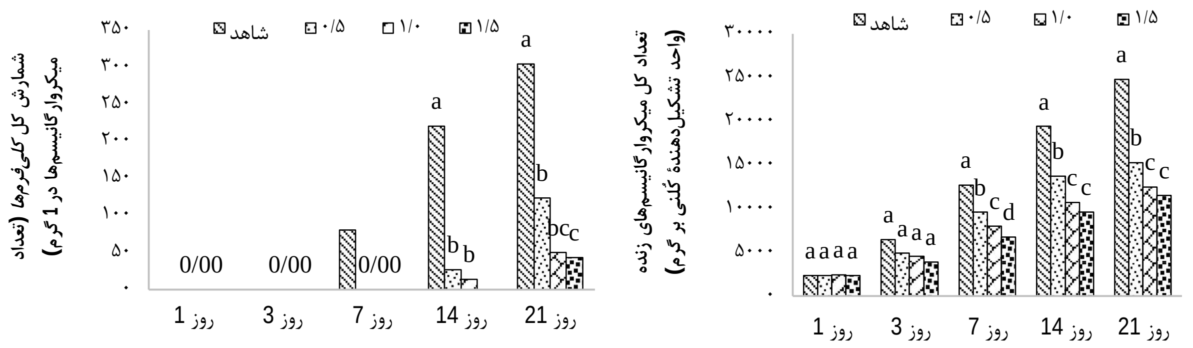
در بررسی‌های انجام‌شده توسط Benali و همکاران (2020) خاصیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی *آچیلا اودوراتاو روتا مونتانا* را نشان دادند، از میان ترکیبات فرار یافت‌شده، 2-آن دکانون، 2-اودکانول، کامفور، برنیل استات، برنئول خاصیت ضدمیکروبی و 1و8-سینئول، کامفور و برنئول خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند. در مطالعهٔ حاضر هیچ‌کدام از ترکیبات ذکرشده وجود ندارد. Dagdelen و همکاران (2014) خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی پنیر اوتلو غنی‌شده با اسانس‌های گیاهی گزارش کردند، که طبقه‌بندی ترکیبات فرار در اسانس‌های گیاهی شامل ترپن‌ها، آلدهیدها، الکل‌ها، کتون‌ها، استرها، بنزوئیدها و سولفورها می‌باشند. آنها بیشترین فراوانی‌ها را مربوط به ترپن‌ها دانستند. آلفا-پینن، آلفا-ترپینن، ال-لیمونن، آلو-اوسیمن، بتا-میرسن، دی-لیمونن، بتا-فلاندرن، بتا-سیس-اوسیمن، بتا-ترنس-اوسیمن، آنولن، ژرماکرن، هگزانال، هپتانال، اتیل استات، ژرانیول استات، متیل بنزن و متیل استایرن ترکیبات فراری با خاصیت ضدمیکروبی هستند و متانول نقش آنتی‌اکسیدانی دارد. در مطالعهٔ حاضر آلفا-پینن و بتا-میرسن در پنیر غنی‌شده با 1 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین و هگزانال در نمونهٔ شاهد و پنیر غنی‌شده با 1 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین یافت شد.

در تحقیق Mohamed و همکاران (2013) خاصیت ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی در کیفیت پنیر و ماست را نشان دادند، از میان ترکیبات فرار یافت‌شده، آلفا-پینن خاصیت ضدمیکروبی و ضدقارچی و کاروون خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند. در مطالعهٔ حاضر آلفا-پینن و لیمونن فقط در پنیر غنی‌شده با 1 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین یافت شد.

آنالیزهای میکروبی پنیر غنی‌شده

آلودگی پنیر با *استافیلوکوکوس اورئوس* ازطریق تهیهٔ غیربهداشتی و نگهداری غیرصحیح پنیر و یا آلودگی شیر خام صورت می‌گیرد. *استافیلوکوکوس اورئوس* قادر به تولید انتروتوکسین می‌باشد که باعث مسمومیت غذایی می‌گردد (Donnelly, 1990). منابع احتمالی *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند از گاوهایی باشد که دچار ورم پستان هستند زیرا گفته می‌شود *استافیلوکوکوس اورئوس* باکتری گرم مثبت است که با ورم پستان در گاو همراه است (Cremonesi *et al.*, 2007). Kümmel و همکاران (2016) گزارش دادند *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌طور مؤثری ازطریق شیر آلودهٔ گاو مبتلا به ورم پستان تحت بالینی وارد زنجیرهٔ تولید لبنیات شده است. در مطالعه‌ای دیگر که روی میزان شیوع باکتری‌های پاتوژن در پنیرهای سنتی انجام گرفت، نتایج نشان داد از 200 نمونه پنیر 59/9 درصد آنها به *استافیلوکوکوس اورئوس* 4/35 لگاریتم واحد تشکیل کُلنی بر میلی‌لیتر آلوده بودند (Ghadiri Hakim *et al.*, 2021). همچنین در مطالعه‌ای به ارزیابی پاتوژن‌هایی با منشأ غذایی در پنیرهای حاصل از شیر خام انجام گرفت و نتایج نشان داد که از 245 نمونه پنیر 100 درصد نمونه‌ها آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* 2/52 واحد تشکیل کُلنی بر گرم بوده است (Costanzo *et al.*, 2020).

نتایج حاصل از شمارش تعداد کل باکتری‌ها در شکل (4-الف) نشان داد تفاوت معنی‌داری در میزان تعداد کل باکتری‌ها در روزهای 1 و 3 در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد مشاهده نشد (P<0/05). به‌طورکلی معنی‌داری میزان تعداد کل باکتری‌ها در روز 7 در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد کاهش یافت (P<0/05). همچنین میزان تعداد کل باکتری‌ها در غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد، 1/88 برابر و در روزهای 14 و 21 نسبت به نمونهٔ شاهد به‌ترتیب 2/02 و 2/16 برابر کاهش یافت.



شکل 4- تأثیر غلظت‌های مختلف رنگدانهٔ فیکوسیانین بر کاهش میزان تعداد الف) کل باکتری و ب) *کلی‌فرم*، حروف‌های متفاوت روی تیرک‌ها نشان‌دهندهٔ اختلاف آماری معنی‌داری می‌باشد ($P<0/05$).

باتوجه‌به نتایج شکل (4-ب) باکتری *کلی‌فرم* در روزهای 1، 3 و 7 مشاهده نشد. میزان *کلی‌فرم* در روز 14 در نمونهٔ شاهد 17×10^1 بیشترین تعداد احتمالی باکتری‌ها در هر گرم بود و با افزودن غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین، *کلی‌فرم* مشاهده نشد. میزان *کلی‌فرم* در روز 14 در غلظت‌های 0/5 و 1 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($P<0/05$) و در روز 21 غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد، 7 برابر کاهش یافت. باتوجه‌به نتایج، باکتری‌های *اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس* در روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین مشاهده نشد. در مطالعهٔ حاضر، *کلی‌فرم* در روزهای 1، 3 و 7 مشاهده نشد، اما در روز 14 در غلظت 1 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین و در روز 21 در غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد میزان *کلی‌فرم* به‌ترتیب 16/50 و 7 برابر کاهش یافت.

همچنین نتایج مشابهی در مطالعهٔ Terpou و همکاران (2021) روی غلظت‌های 0/25، 0/5 و 1 ٪ گرم بر کیلوگرم رنگدانهٔ فیکوسیانین بر پنیر فتا به‌دست‌آمد. در مطالعهٔ حاضر در روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 باکتری *اشریشیاکلی* در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین مشاهده نشد. همچنین نتایج مشابهی در مطالعهٔ Ericsson و Sherris (1971) مرتبط با اثر رنگدانهٔ فیکوسیانین روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی به‌دست‌آمد. در مطالعهٔ حاضر تفاوت معنی‌داری در میزان تعداد کل باکتری‌ها در روزهای 1 و 3 در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد، وجود ندارد ($P<0/05$). به‌طور معنی‌داری میزان تعداد کل باکتری‌ها در روز 7 در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد کاهش یافت ($P<0/05$)، همچنین میزان تعداد کل باکتری‌ها در غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد 1/88 برابر و در روزهای 14 و 21 به‌ترتیب 2/02 و 2/16 برابر کاهش یافت.

اشریشیاکلی فلور طبیعی رودهٔ تمام حیوانات خون‌گرم می‌باشد. تعداد این باکتری‌ها در رودهٔ انسان و گوشت‌خوران بیش از رودهٔ علف‌خواران است. حضور این باکتری در آب و مواد غذایی به‌عنوان شاخص آلودگی مدفوعی و حضور احتمالی پاتوژن‌های غالب پذیرفته شده است (Beutin *et al.*, 1993). یکی از سویه‌های مهم *اشریشیاکلی* سویهٔ O157:H7 می‌باشد که باعث بروز چند فقره مرگ شده و ازطریق مواد غذایی با منشأ دامی به انسان منتقل می‌شود و توانایی تولید شیگا توکسین را دارد. در سال 2013 در کانادا؛ *اشریشیاکلی* سویهٔ O157:H7 در نمونه‌های پنیر گودا، 83 روز پس از تولید شناسایی شد (Currie *et al.*, 2018). همچنین در اروپا عامل آلودگی پنیر توسط *اشریشیاکلی* تولیدکنندهٔ شیگا توکسین (STEC[1]) گزارش شده است (EFSA & ECDC, 2019). در مطالعهٔ حاضر *اشریشیاکلی* در هیچ‌کدام از نمونه‌ها (شاهد، 0/5، 1 و 1/5 درصد) مشاهده نشد. در تحقیق Baniassadi و Azhdari (2017) روی 60 نمونه پنیر سنتی آلوده به *کلی‌فرم*، *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، کپک و مخمر 10^4-28×10^6 واحد تشکیل‌دهندهٔ کُلنی بر گرم به‌دست‌آمد (Baniassadi & Azhdari, 2017; Griffin *et al.*, 2020). مطالعهٔ Shadan و Khoshabi (2003) نشان داد آلودگی ایجادشده در پنیرهای سنتی ممکن است در هنگام تهیه، جابجایی، توزیع و ذخیره‌سازی نادرست در طول فرایند تهیه و توزیع اتفاق افتد. همچنین در بررسی‌های صورت‌گرفته پنیرهای سنتی آلودگی بیش‌ازحد مجاز به *اشریشیاکلی*،

[1] Shiga toxin producing *Escherichia coli*

استافیلوکوکوس اورئوس و *کلی‌فرم* داشتند. Trmčić و همکاران (2016) نشان دادند که شیر غیرپاستوریزه منبع *کلی‌فرم* در پنیر است و احتمال تشخیص مثبت *کلی‌فرم‌ها* در شیر غیرپاستوریزه 4/6 برابر بیشتر است. این میکروب می‌تواند در محصولات نهایی و همچنین در کل زنجیرهٔ لبنیات باقی‌بماند. بنابراین وجود این باکتری‌های شاخص در نمونه‌های آزمایش‌شده نشان‌دهندهٔ اعمال غیربهداشتی در حین فراوری و عدم عملیات حرارتی در حین تولید است. همچنین گزارش شد پنیرهای غیرپاستوریزه در مقایسه با پنیرهای پاستوریزه به *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده‌اند (Salek Moghadam *et al.*, 2001). نتایج حاصل از سایر مطالعه‌های صورت‌گرفته آلودگی میکروبی پنیرهای سنتی را بیانگر آلودگی میکروبی بیش‌ازحد مجاز استاندارد این محصول اعلام نمودند (Akbarmehr, 2003; Yousefi Mashouf, 2002).

شیر و سایر محصولات بایستی ازنظر میکروبی در حد قابل‌قبولی باشند. در ساخت این‌گونه پنیرها از شیر پاستوریزه‌نشده استفاده می‌شود و اگر شیر حاوی باکتری‌های بیماری‌زا شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *کلی‌فرم* و یا آلودگی ثانویه در حین تولید پنیر به‌وجودآید، این امر موجب مسمومیت غذایی و نیز عفونت‌های غذایی ناشی از حضور میکروارگانیسم و یا سموم تولیدشده توسط آن می‌گردد (Salek Moghadam *et al.*, 2001). در این میان، کنترل بیولوژیکی یکی از روش‌های مؤثر برای مدیریت تولید و نگهداری و کیفیت مواد غذایی است، ازاین‌رو، امروزه استفاده از رنگدانه‌های خوراکی جهت ارتقای بار میکروبی محصولات غذایی به‌طورکلی نوآورانه و مقرون‌به‌صرفه است. در مطالعهٔ حاضر با اضافه‌نمودن غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین به پنیر، میزان *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* منفی و مشاهده نشد، میزان *کلی‌فرم* را تا روز 21 و میزان شمارش کلی میکروبی را تا روز 7 کاهش داده است. در مطالعهٔ انجام‌شده توسط Younis و همکاران (2020) از رنگدانهٔ فیکوسیانین *اسپیرولینا* در جهت بهبود کیفیت میکروبی پنیر در مقابل *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد که با افزایش غلظت رنگدانهٔ فیکوسیانین تا 20 میلی‌لیتر در لیتر فعالیت بازدارندگی به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. نتایج تحقیق Terpou و همکاران (2021) نشان دادند با افزودن غلظت‌های مختلف رنگدانهٔ فیکوسیانین به پنیر باعث کاهش تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* شده است.

اندازه‌گیری پتانسیل آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP

نتایج ارزیابی میزان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP نشان داد در روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 میزان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P<0/05$)، به‌طوری‌که این میزان در غلظت 1/5 درصد در روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 به‌ترتیب 0/82، 0/80، 0/76، 0/74 و 0/75 برابر نسبت به نمونهٔ شاهد افزایش یافته است (شکل 5-الف). ریزجلبک‌ها گونه‌های مهمی هستند و به‌دلیل دارابودن ترکیباتی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی از آسیب توسط گونه‌های فعال اکسیژن[1] جلوگیری می‌کنند (El Baz *et al.*, 2002). گزارش‌های ثبت‌شده نشان می‌دهد *اسپیرولینا* از آسیب اکسیداتیو و ابتلابه سرطان را کاهش می‌دهد و ازاین‌رو، مصرف غذاهایی با نقش خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد افزایش‌یافته و محافظت در برابر آسیب‌های اکسیداتیو را انجام می‌دهد (Anbarasan *et al.*, 2011; Pariza *et al.*, 2001; Romay *et al.*, 2003). در مطالعهٔ حاضر میزان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP نشان داد در روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 میزان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P<0/05$)، به‌طوری‌که میزان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در غلظت 1/5 در روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 به‌ترتیب 0/82، 0/80، 0/76، 0/74 و 0/75 برابر نسبت به نمونهٔ شاهد افزایش یافته است. باتوجه‌به بالابودن پتانسیل آنتی‌اکسیدانی رنگدانهٔ فیکوسیانین، به‌دلیل افزودن رنگدانهٔ فیکوسیانین به پنیر در غلظت‌های مختلف در طول زمان‌های نگهداری باعث ایجاد بیشتر ترکیبات فراری که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (آلفا-پینن، لیمونن، بتا-میرسن و غیره) را دارند، می‌شود که منجربه تفاوت معنی‌داری فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با نمونهٔ شاهد خواهد شد.

Hajimahmoodi و همکاران (2010) نشان دادند برای کاهش یون فریک از پتانسیل آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP استفاده می‌شود. آزمون فعالیت آنتی‌اکسیدانی احیا، روشی است که به‌طور مستقیم رادیکال‌های آزاد موجود در نمونه‌ها را شناسایی می‌کند و رابطهٔ خطی با غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها دارند (Prior *et al.*, 2005). طبق مطالعه‌های انجام‌شده روی ارزیابی FRAP نشان داد روش FRAP وابسته به دُز است. با افزودن غلظت‌های فیکوسیانین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد (Punampalam *et al.*, 2018). امروزه برای مهار رادیکال‌های آزاد برای تخمین خواص آنتی‌اکسیدانی از

[1] Reactive oxygen species

محلول‌های زیستی استفاده می‌شود. استفاده از محلول‌های 1و1-دی‌فنیل-2-پیکریل هیدرازیل از رایج‌ترین روش‌های ارزیابی محتوای آنتی‌اکسیدانی است که به‌علت سهولت و تطابق بالا کاربرد روزافزونی یافته است (Mishra *et al.*, 2010).

اندازه‌گیری سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH نشان داد میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد کاهش یافته است (P<0/05)، به‌طوری‌که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 در غلظت 1/5 درصد به‌ترتیب 1/43، 1/52، 1/52، 1/72 و 2/13 برابر نسبت به نمونهٔ شاهد کاهش یافته است (شکل 5-ب).

Romay و همکاران (2003) نشان دادند رنگدانهٔ فیکوسیانین دارای خواص مهار انواع رادیکال آزاد مضر از قبیل آلکوکسی، هیدروکسی و پراکسید بوده و با گذر زمان به‌دلیل کم‌شدن فعالیت آنتی‌اکسیدانی خاصیت مهار در آنها کاهش می‌یابد. محققان فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانهٔ فیکوسیانین *اسپیرولینا* به روش DPPH را وجود فنول‌ها با مقدار بالای از مواد فیتوشیمیایی بیولوژیکی فعال (استرول‌ها، فلاونوئیدها، تانین‌ها، آنتراکوئنون‌ها) نسبت دادند (Shalaby *et al.*, 2010). در مطالعهٔ حاضر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد کاهش یافته است (P<0/05)، به‌طوری‌که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 در غلظت 1/5 درصد به‌ترتیب 1/43، 1/52، 1/52، 1/72 و 2/13 برابر نسبت به نمونهٔ شاهد کاهش یافته است. در واقع هرچه IC_{50} کمتر باشد، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در آن غلظت بیشتر است، براین‌اساس، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در غلظت 1/5 و 0/5 درصد بیشتر از نمونهٔ شاهد است. نتایج تأثیر زیست‌تودهٔ *اسپیرولینا پلاتنسیس* روی پارامترهای کیفی بیسکویت‌های کوچک اسکاتلندی[1] به روش DPPH توسط Marcinkowska-Lesiak و همکاران (2018) نشان دادند با گذشت زمان از قدرت آنتی‌اکسیدانی کاسته می‌شود.

ارزیابی میزان به‌دام‌اندازی نیتریک اکسید

نتایج ارزیابی میزان به‌دام‌اندازی نیتریک اکسید نشان داد میزان به‌دام‌اندازی نیتریک اکسید در روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد افزایش یافته است (P<0/05)، به‌طوری‌که میزان به‌دام‌اندازی نیتریک اکسید در روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 در غلظت 1/5 درصد به‌ترتیب 0/92، 0/91، 0/87، 0/85 و 0/84 برابر نسبت به نمونهٔ شاهد افزایش یافته است (شکل 5-ج). نیتریک اکسید رادیکال فعالی است که در به‌دام‌اندازی نیتریک اکسید با اکسیژن رقابت کرده و تولید نیتریت را کاهش می‌دهد. به‌دام‌اندازی نیتریک اکسید می‌تواند به‌عنوان سازوکاری برای بروز اثرات ضدالتهابی یا ضدتشنجی درنظرگرفته شود (Hosseinzadeh *et al.*, 2005). تولید مقادیر بالای نیتریک اکسید به‌طور موضعی در بیماری‌های روماتیک (مفاصل، کلیه، رگ‌های خونی، سیستم عصبی مرکزی) شرکت می‌کند (Manna *et al.*, 2008). در مطالعهٔ حاضر میزان به‌دام‌اندازی نیتریک اکسید در روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به نمونهٔ شاهد افزایش یافته است (P<0/05)، به‌طوری‌که میزان به‌دام‌اندازی نیتریک اکسید در روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 در غلظت 1/5 درصد به‌ترتیب 0/92، 0/91، 0/87، 0/85 و 0/84 برابر نسبت به نمونهٔ شاهد افزایش یافته است. به‌دلیل افزودن رنگدانهٔ فیکوسیانین به پنیر در غلظت‌های مختلف در طول زمان‌های نگهداری میزان به‌دام‌اندازی نیتریک اکسید بیشتر شده است که نشان‌دهندهٔ فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر است. مشابه نتایج حاضر، ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش به‌دام‌اندازی نیتریک اکسید رنگدانهٔ فیکوسیانین *اسپیرولینا پلاتنسیس* در شرایط آزمایشگاهی انجام شد و نتایج نشان داد فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به دُز است که با افزایش رنگدانهٔ فیکوسیانین فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد (Anbarasan *et al.*, 2011).

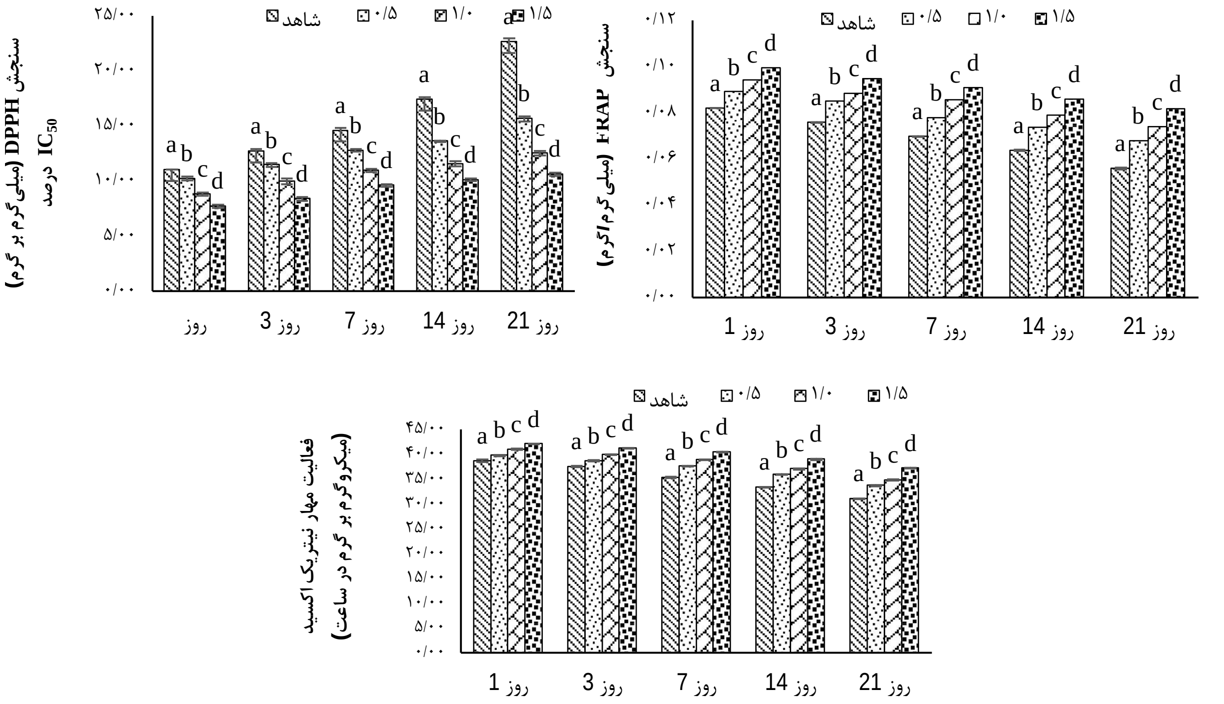
در مطالعهٔ مشابهی استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانین از پودر خشک *اسپیرولینا پلاتنسیس* در غلظت‌های 10، 25، 50 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدانعقادی و جلوگیری از آسیب DNA آن به‌دست‌آمد (Kamble *et al.*, 2013). ویژگی‌های حسی نقش مهمی در مقبولیت کلی محصولات غذایی توسط مصرف‌کنندگان دارد. بنابراین اگر مواد ترکیب‌شده طعم‌های ناخوشایندی ایجاد کنند، مصرف‌کنندگان از غذاهای کاربردی اجتناب می‌کنند. نتایج مطالعهٔ Bosnea و همکاران (2021) نشان داد که با افزایش رنگدانهٔ فیکوسیانین *اسپیرولینا* میزان رضایت بویایی پنیر سنتی یونانی کاهش معنی‌داری دارد. با افزایش رنگدانهٔ فیکوسیانین میزان رضایت‌مندی در هر روز

[1] Shortbread

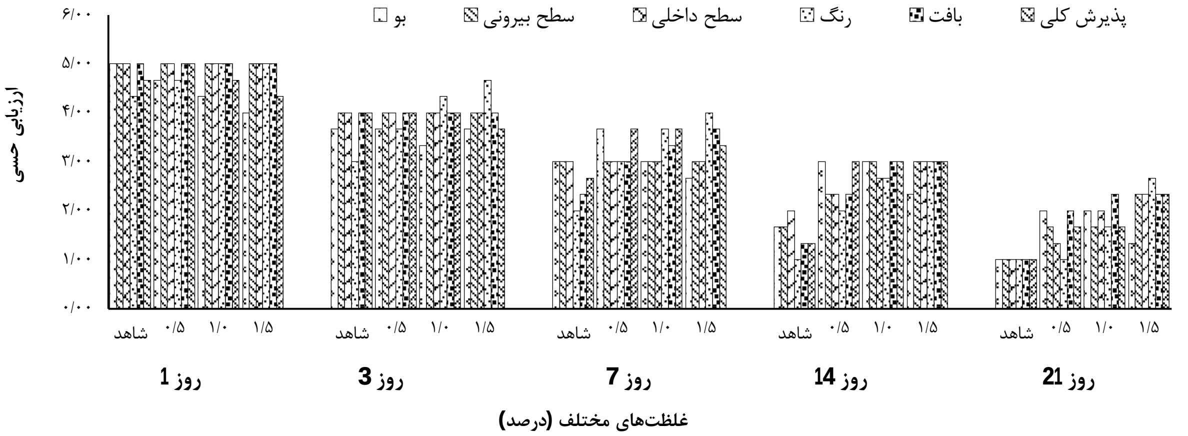
افزایش می‌یابد (به‌جز بویایی). در واقع افزودن رنگدانهٔ فیکوسیانین *اسپیرولینا پلاتنسیس* باعث ایجاد بوی نامطبوع شبیه بوی ماهی می‌شود که ناشی از محتوای مواد معدنی آن است (Winarni Agustini *et al*., 2016). محققان روش‌هایی را برای کاهش بوی مرتبط با جلبک *اسپیرولینا* با استفاده از جذب ذغال فعال، حرارت‌دادن، هیدرولیز آنزیم لیزوزیم، گنجاندن بتا-سیکلودکسترین، تخمیر و استخراج حلال بررسی کرده‌اند. تخمیر و استخراج با اتانول به‌عنوان مؤثرترین روش کاهش بوی جلبک مانند *اسپیرولینا* ثابت شده است (Bao *et al*., 2018). در مطالعهٔ حاضر نتایج حاصل از ارزیابی در پنیر غنی‌شده با رنگدانهٔ فیکوسیانین نشان داد که ارتباط مستقیمی در میزان رضایت بین ارزیابی حسی با افزایش غلظت رنگدانهٔ فیکوسیانین به‌غیراز بو و پذیرش کلی وجود دارد ($P<0/05$). به‌طورکلی میزان رضایت با افزایش غلظت فیکوسیانین منجربه‌کاهش رضایت از بو و پذیرش کلی شد.

ارزیابی حسی پنیر غنی‌شده

نتایج شکل (6) نشان داد ارتباط مستقیمی در میزان رضایت بین ارزیابی حسی با افزایش غلظت رنگدانهٔ فیکوسیانین به‌غیراز بو و پذیرش کلی وجود دارد ($P<0/05$). در واقع میزان رضایت با افزایش غلظت فیکوسیانین منجربه‌کاهش رضایت از بو و پذیرش کلی شد.



شکل 5- سنجش میزان الف) FRAP، ب) DPPH و ج) به‌دام‌اندازی نیتریک اکسید در پنیر غنی‌شده با رنگدانهٔ فیکوسیانین، حروف‌های متفاوت روی تیرک‌ها نشان‌دهندهٔ اختلاف آماری معنی‌داری می‌باشد ($P<0/05$).



شکل 6- ارزیابی حسی پنیر غنی‌شده با رنگدانهٔ فیکوسیانین

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه‌ها نشان داد که افزودن غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین به پنیر سنتی طی روزهای 1، 3، 7، 14 و 21 و صرف زمان بیشتر موجب کاهش آلودگی پنیر به باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلی‌فرم* گردیده و میزان تعداد کل باکتری‌ها را تقلیل داده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش پروتئین، کاهش چربی، ثابت ماندن خاکستر، کاهش pH و افزایش بتا-کاروتن از یافته‌های این مطالعه است. محتوای رطوبت روزهای 1، 3 و 7 در غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به کنترل کاهش یافت، به‌طوری‌که میزان رطوبت در روز 21 غلظت 1/5 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین نسبت به کنترل افزایش یافت. همچنین نتایج ترکیبات فرار حاصل از آزمایش GC-MS در نمونهٔ شاهد و پنیر غنی‌شده با 1 درصد رنگدانهٔ فیکوسیانین شامل 5-آلدهید، 10-استر، 4-کتون، 4-الکل، 6-اسید و 1-بنزن می‌باشد، که بعضی از این ترکیبات شامل لیمونن، بتا-میرسن، آلفا-پینن و بتا-پینن و غیره خاصیت ضدمیکروبی دارند. باتوجه‌به نتایج حاصله در ارزیابی بو با افزایش غلظت رنگدانهٔ فیکوسیانین از مقبولیت آن کاسته شد اما میزان مقبولیت سایر پارامترها امکان پاسخگویی به سطح تقاضای جامعه دربارهٔ محصولات غنی‌شده فراهم خواهد گردید، لذا عملکرد بهینه، تحقق و توسعه درزمینهٔ به‌کارگیری رنگدانهٔ فیکوسیانین در صنایع غذایی ایران را می‌طلبد.

تشکر و قدردانی

این مقاله هیچ‌گونه حمایت مالی و معنوی ندارد.

مشارکت نویسندگان

نیکان ایری: جمع‌آوری داده‌ها، نوشتن پیش‌نویس مقاله؛ **بهاره نوروزی**: تجزیه‌تحلیل و تفسیر داده‌ها، آنالیز داده‌ها، ارائهٔ ایدهٔ پژوهشی و طراحی مطالعه، بازبینی و اصلاح مقاله، نظرات بر مطالعه، تأیید نسخهٔ نهایی؛ **شکوفه قاضی**: بازبینی و اصلاح مقاله.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

منابع

Academy of General Dentistry. (2013, June 5). *Cheese may prevent cavities.* ScienceDaily. Retrieved Retrieved June 1, 2023 from www.sciencedaily.com/releases/2013/06/130605130118.htm

Akalin, A., Unal, G., & Dalay, M. (2009). Influence of Spirulina platensis biomass on microbiological viability in traditional and probiotic yogurts during refrigerated storage. *Italian Journal of Food Science*, *21*(3), 357-364.

Akbarmehr, J. (2003). A survery on the contamination of fresh white cheese produced in sarab city and rural area with brucella spp. *Journal of Veterinary Research*, *58*(3), 203-206. https://jvr.ut.ac.ir/article_11905_a2cc5e5aa4684ee0739db66f3a9af50a.pdf

Alrubaie, G., Zaki, N. H., Al-Hashimi, A., & Khuyon, A. (2021). Antibacterial Effect of Spirulina platensis Extracts on the Viability of Bacterial Species Isolated form Acne Patients in Baghdad. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 3851-3859.

Anbarasan, V., Kumar, V. K., Kumar, P. S., & Venkatachalam, T. (2011). In vitro evaluation of antioxidant activity of blue green algae Spirulina platensis. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, *2*(10), 2616. https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2(10).2616-18

Ansarifard, F., Rajabi Islami, H., Shamsaie Mehrjan, M., & Soltani, M. (2018). Effects of Arthrospira platensis on growth, skin color and digestive enzymes of Koi, Cyprinus carpio [Orginal research papers]. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *17*(2), 381-393. http://dorl.net/dor/20.1001.1.15622916.2018.17.2.10.0 (in Persian)

Ao, C., Li, A., Elzaawely, A. A., Xuan, T. D., & Tawata, S. (2008). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of Ficus microcarpa L. fil. extract. *Food Control*, *19*(10), 940-948. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.09.007

AOAC. (1990). Protein (crude) in animal feed kajeldahl method (954.01 methods). In: Association of Official Analytical Chemists Inc., Arlington, VA, USA.

Aygun, O., Aslantas, O., & Oner, S. (2005). A survey on the microbiological quality of Carra, a traditional Turkish cheese. *Journal of Food Engineering*, *66*(3), 401-404. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.04.013

Baniassadi, B., & Azhdari, A. (2017). Survey of the total microbial count and the rate of contamination to coliform, staphylococcus aureus and mold and yeast in traditional cheese in Birjand during 2015. *Journal of Food Microbiology*, *4*(1), 29-37. https://jfm.shahrekord.iau.ir/article_654470_628c46e20f9f046128142968cd487145.pdf (in Persian)

Bao, J., Zhang, X., Zheng, J.-H., Ren, D.-F., & Lu, J. (2018). Mixed fermentation of Spirulina platensis with Lactobacillus plantarum and Bacillus subtilis by random-centroid optimization. *Food chemistry*, *264*, 64-72. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.027

Bchir, B., Jean-François, T., Rabetafika, H. N., & Blecker, C. (2018). Effect of pear apple and date fibres incorporation on the physico-chemical, sensory, nutritional characteristics and the acceptability of cereal bars. *Food Sci Technol Int*, *24*(3), 198-208. https://doi.org/10.1177/1082013217742752

Beheshtipour, H., Mortazavian, A. M., Mohammadi, R., Sohrabvandi, S., & Khosravi-Darani, K. (2013). Supplementation of Spirulina platensis and Chlorella vulgaris Algae into Probiotic Fermented Milks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*(2), 144-154. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12004

Benali, T., Habbadi, K., Khabbach, A., Marmouzi, I., Zengin, G., Bouyahya, A., . . . Hammani, K. (2020). GC-MS Analysis, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Achillea Odorata Subsp. Pectinata and Ruta Montana Essential Oils and Their Potential Use as Food Preservatives. *Foods*, *9*(5). https://doi.org/10.3390/foods9050668

Bensehaila, S., Doumandji, A., Boutekrabt, L., Manafikhi, H., Peluso, I., Bensehaila, K., . . . Bensehaila, A. (2015). The nutritional quality of Spirulina platensis of Tamenrasset, Algeria. *African Journal of Biotechnology*, *14*(19), 1649-1654.

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70-76. https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292

Beutin, L., Geier, D., Steinrück, H., Zimmermann, S., & Scheutz, F. (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing Escherichia coli in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol*, *31*(9), 2483-2488. https://doi.org/10.1128/jcm.31.9.2483-2488.1993

Bosnea, L., Terpou, A., Pappa, E., Kondyli, E., Mataragas, M., Markou, G., & Katsaros, G. (2021). Incorporation of Spirulina platensis on Traditional Greek Soft Cheese with Respect to Its Nutritional and Sensory Perspectives. *Proceedings*, *70*(1), 99. https://doi.org/10.3390/foods_2020-07600

Buhler, S., Riciputi, Y., Perretti, G., Caboni, M. F., Dossena, A., Sforza, S., & Tedeschi, T. (2020). Characterization of Defatted Products Obtained from the Parmigiano-Reggiano Manufacturing Chain: Determination of Peptides and Amino Acids Content and Study of the Digestibility and Bioactive Properties. *Foods*, *9*(3). https://doi.org/10.3390/foods9030310

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*(3), 223-253. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

Burt, S. A. (2007). *Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food.* Utrecht University.

Busch, S. (2018, Novamber 21). *Cheese & Vitamin B-12*. Hearst Newspapers, a Division of Hearst Communication, Inc. https://www.weekand.com/healthy-living/article/cheese-vitamin-b12-18006691.php

Choki, K., Zangmo, S., & Norbu, P. T. (2021). Microbial quality of traditionally produced butter and cheese (datshi). *Bhutan Journal of Animal Science*, *5*(1), 1-7.

Costanzo, N., Ceniti, C., Santoro, A., Clausi, M. T., & Casalinuovo, F. (2020). Foodborne Pathogen Assessment in Raw Milk Cheeses. *International journal of food science*, *2020*, 3616713. https://doi.org/10.1155/2020/3616713

Cremonesi, P., Perez, G., Pisoni, G., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M., . . . Castiglioni, B. (2007). Detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolates in raw milk cheese. *Lett Appl Microbiol*, *45*(6), 586-591. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02231.x

Currie, A., Galanis, E., Chacon, P. A., Murray, R., Wilcott, L., Kirkby, P., . . . for the Investigative, T. (2018). Outbreak of Escherichia coli O157:H7 Infections Linked to Aged Raw Milk Gouda Cheese, Canada, 2013. *Journal of Food Protection*, *81*(2), 325-331. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-283

da Fontoura Prates, D., Duarte, J. H., Vendruscolo, R. G., Wagner, R., Ballus, C. A., da Silva Oliveira, W., . . . Costa, J. A. V. (2020). Role of light emitting diode (LED) wavelengths on increase of protein productivity and free amino acid profile of Spirulina sp. cultures. *Bioresour Technol*, *306*, 123184. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123184

Dagdelen, S., Bilenler, T., Durmaz, G., Gokbulut, I., Hayaloglu, A. A., & Karabulut, I. (2014). Volatile Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Herbal Plants Used in the Manufacture of Van Herby (OTLU) Cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*, *38*(4), 1716-1725. https://doi.org/10.1111/jfpp.12134

Devi, K. M., & Mehta, S. K. (2016). Antimicrobial activities of freshwater Cyanobacterium, Nostoc sp. from Tamdil Wetland of Mizoram, India: an identification of bioactive compounds by GC-MS. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)*, *7*(3), 1179-1191. https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(3).1179-91

Donnelly, C. W. (1990). Concerns of Microbial Pathogens in Association with Dairy Foods. *Journal of dairy Science*, *73*(6), 1656-1661. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78838-8

Duan, Y., Tan, Z., Wang, Y., Li, Z., Li, Z., Qin, G., . . . Cai, Y. (2008). Identification and characterization of Lactic Acid Bacteria isolated from Tibetan Qula cheese. *J Gen Appl Microbiol*, *54*(1), 51-60. https://doi.org/10.2323/jgam.54.51

EFSA, & ECDC. (2019). European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union one health 2018 zoonoses report. *EFSa Journal*, *17*(12), e05926.

El Baz, F. K., Aboul-Enein, A. M., El-Baroty, G. S., Youssef, A., & Abdel-Baky, H. H. (2002). Accumulation of antioxidant vitamins in Dunaliella salina. *Journal of Biological Sciences*, *2*(4), 220-223. https://doi.org/10.3923/jbs.2002.220.223

Ericsson, H. M., & Sherris, J. C. (1971). Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*, *217*, Suppl 217:211+.

Fadaei, V., Mazinani, S., Khosravi-Darani, K., Eslami Moshkenani, A., & Mirzadeh, A. (2015). The effect of powdered Spirulina platensis biomass on some of physicochemical properties and sensory evaluation in probiotic Iranian white cheese containing powdered Mentha longifolia L. produced by ultrafiltration. *Innovative Food Technologies*, *2*(3), 1-10. https://doi.org/10.22104/jift.2015.125 (in Persian)

Farghl, A., El-Sheekh, M. M., & Mousa, A. (2019). Extraction and characterization of antimicrobial active substance from cyanobacteria Nostoc carneum and Anabaena circinalis. *Fresenius environmental bulletin*, *28*(7), 5481-5490.

Ghadiri Hakim, H., Jamali Behnam, Y., Hashemi, M., Miri Disfani, A., Torbati Moghaddam, M. R., & Afshari, A. (2021). Prevalence of Pathogenic Microorganisms in Traditional Dairy Products of Mashhad, Iran [Original Article]. *Journal title*, *7*(3), 152-158. https://doi.org/10.52547/jhehp.7.3.152

Ghazi Zadeh, M., & Razaghi, A. (1999). *A textbook of Sensory evaluation of foods* (Vol. 11th). Shahid Beheshti University, Faculty of Nutrition Sciences and food technology.

Griffin, S., Falzon, O., Camilleri, K., & Valdramidis, V. P. (2020). Bacterial and fungal contaminants in caprine and ovine cheese: A meta-analysis assessment. *Food Research International*, *137*, 109445. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109445

Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M. A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M. R., & Nafissi-Varcheh, N. (2010). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, *22*(1), 43-50. https://doi.org/10.1007/s10811-009-9424-y

Halith, A. M., Elumalai, S., & Sampathkumar, Y. (2020). Studies on arsenic absorption, adsorption, accumulation and analysis of biofuel compounds in microalgae for the use of arsenic detoxification and biofuel productions. *International Journal for Research in Engineering Application & Management (IJREAM)*, *6*(1), 532-547. https://doi.org/10.35291/2454-9150.2020.0344

Hosseinzadeh, H., Karimi, G.-R., & Rakhshanizadeh, M. (2005). Anticonvulsant effect of Hypericum perforatum: role of nitric oxide. *Journal of Ethnopharmacology*, *98*(1), 207-208. https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.12.007

Ibrahim, O. A. E.-H., Mohamed, A. G., & Bahgaat, W. K. (2019). Natural peppermint-flavored cheese. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*, *18*(1), 75-85. https://doi.org/10.17306/J.AFS.2019.0607

Iran National Standards Organization (INSO). (1977). *Determination of the ash content of processed cheese, (INSO Standard No. 1755, 1st Edition*. http://standard.isiri.gov.ir/StandardFiles/1755.htm (in Persian)

Iran National Standards Organization (INSO). (1999). *Method for sensory evaluation of cheese, (INSO Standard No. 4938)*. http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=10693 (in Persian)

Iran National Standards Organization (INSO). (2002a). *Cheese- general specifications, (INSO Standard No. 2344, 2st Revision)*. http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=997 (in Persian)

Iran National Standards Organization (INSO). (2002b). *Cheese and processed cheese-determination of total solids, (reference method)-test method, (INSO Standard No. 1753, 1st Revision)*. http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=8430 (in Persian)

Iran National Standards Organization (INSO). (2010). *Food and feed products ñDetermination of nitrogen by the kejeldahl method-General guidelines, (INSO Standard No. 13483, 1st Edition)*. http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=6162 (in Persian)

Iran National Standards Organization (INSO). (2014). *Cheese and processed cheese products-Determination of fat content-Gravimetric method (Reference method), (INSO Standard No. 17602, 1st Edition)*. http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=41272

Iran National Standards Organization (INSO). (2015). *Microbiology of the food chain-Horizontal method for the enumeration of microorganisms-Part 1:Colony count at 30 °C by the pour plate technique, (INSO Standard No. 5272-1, 1st Edition)*. http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=43263

Iran National Standards Organization (INSO). (2022). *Milk and milk products-Determination of titrable acidity and pH-Test method, (INSO Standard No. 2852, 2nd Revision)*. http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=57037

Izco, J. M., & Torre, P. (2000). Characterisation of volatile flavour compounds in Roncal cheese extracted by the 'purge and trap' method and analysed by GC–MS. *Food chemistry*, *70*(3), 409-417. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00100-X

Jafari Porzani, S., Konur, O., & Nowruzi, B. (2022). Cyanobacterial natural products as sources for antiviral drug discovery against COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *40*(16), 7629-7644. https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1899050

Jordan, K., Hunt, K., Lourenco, A., & Pennone, V. (2018). Listeria monocytogenes in the Food Processing Environment. *Current Clinical Microbiology Reports*, *5*(2), 106-119. https://doi.org/10.1007/s40588-018-0090-1

Jurkovic, D., Krizková, L., Dusinský, R., Belicová, A., Sojka, M., Krajcovic, J., & Ebringer, L. (2006). Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Lett Appl Microbiol*, *42*(6), 553-559. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01918.x

Kamble, S. P., Gaikar, R. B., Padalia, R. B., & Shinde, K. D. (2013). Extraction and purification of C-phycocyanin from dry Spirulina powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *3*(8), 149-153.

Khairy, H. M., & El-Kassas, H. Y. (2010). Active substance from some blue green algal species used as antimicrobial agents. *African Journal of Biotechnology*, *9*(19), 2789-2800.

Khalili, M., & Ebrahimzadeh, M. A. (2015). A Review on Antioxidants and Some of their Common Evaluation Methods [Review]. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, *24*(120), 188-208. http://jmums.mazums.ac.ir/article-1-4858-en.html (in Persian)

Koba, K., & Yanagita, T. (2014). Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). *Obes Res Clin Pract*, *8*(6), e525-532. https://doi.org/10.1016/j.orcp.2013.10.001

Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., & Drosinos, E. H. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, *21*(6), 805-815. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.11.015

Kümmel, J., Stessl, B., Gonano, M., Walcher, G., Bereuter, O., Fricker, M., . . . Ehling-Schulz, M. (2016). Staphylococcus aureus Entrance into the Dairy Chain: Tracking S. aureus from Dairy Cow to Cheese. *Front Microbiol*, *7*, 1603. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01603

Li, H., Deng, Z., Zhu, H., Hu, C., Liu, R., Young, J. C., & Tsao, R. (2012). Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. *Food Research International*, *46*(1), 250-259. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.014

Licon, C. C., Moro, A., Librán, C. M., Molina, A. M., Zalacain, A., Berruga, M. I., & Carmona, M. (2020). Volatile Transference and Antimicrobial Activity of Cheeses Made with Ewes' Milk Fortified with Essential Oils. *Foods*, *9*(1), 35. https://www.mdpi.com/2304-8158/9/1/35

Manna, I., Liguori, M., Valentino, P., Condino, F., La Russa, A., Clodomiro, A., . . . Quattrone, A. (2008). Preliminary evidences of a NOS2A protective effect from Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, *264*(1), 112-117. https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.08.007

Marcinkowska-Lesiak, M., Onopiuk, A., Zalewska, M., Ciepłoch, A., & Barotti, L. (2018). The effect of different level of Spirulina powder on the chosen quality parameters of shortbread biscuits. *Journal of Food Processing and Preservation*, *42*(3), e13561. https://doi.org/10.1111/jfpp.13561

Mardiani, A., Sumarmono, J., & Setyaward, T. (2013). Total Bakteri Asam Laktat, Kadar Air Dan Protein Keju Peram Susu Kambing Yang Mengandung Probiotik Lactobacillus casei DAN Bifidobacterium longum. *Jurnal Ilmiah Peternakan*, *1*(1), 244-253. http://jos.unsoed.ac.id/index.php/jip/article/view/600

Miller, j. (2017, April). *15 Health Benefits of Cheese, According to Science (+8 Delicious Recipes)*. Retrieved April 29, 2017 from https://www.jenreviews.com/cheese/

Mishra, S. K., Shrivastav, A., Pancha, I., Jain, D., & Mishra, S. (2010). Effect of preservatives for food grade C-Phycoerythrin, isolated from marine cyanobacteria Pseudanabaena sp. *Int J Biol Macromol*, *47*(5), 597-602. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.08.005

Mohamed, S. H., Zaky, W. M., Kassem, J. M., Abbas, H. M., Salem, M., & Said-Al Ahl, H. (2013). Impact of antimicrobial properties of some essential oils on cheese yoghurt quality. *World Applied Sciences Journal*, *27*(4), 497-507.

Nagao, K., & Yanagita, T. (2005). Conjugated fatty acids in food and their health benefits. *Journal of bioscience and bioengineering*, *100*(2), 152-157. https://doi.org/10.1263/jbb.100.152

Nowruzi, B., Sarvari, G., & Blanco, S. (2020). The cosmetic application of cyanobacterial secondary metabolites. *Algal Research*, *49*, 101959. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101959

Ötleş, S., & Pire, R. (2019). Fatty Acid Composition of Chlorella and Spirulina Microalgae Species. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, *84*(6), 1708-1714. https://doi.org/10.1093/jaoac/84.6.1708

Pandey, J. P., & Tiwari, A. (2010). Optimization of biomass production of Spirulina maxima. *J. Algal Biomass Utln*, *1*(2), 20-32.

Parada, J. L., Zulpa de Caire, G., Zaccaro de Mulé, M. a. C., & Storni de Cano, M. M. (1998). Lactic acid bacteria growth promoters from Spirulina platensis. *International Journal of Food Microbiology*, *45*(3), 225-228. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00151-2

Pariza, M. W., Park, Y., & Cook, M. E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res*, *40*(4), 283-298. https://doi.org/10.1016/s0163-7827(01)00008-x

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(10), 4290-4302. https://doi.org/10.1021/jf0502698

Priyanka, M., Kempanna, C., & Narasimha, M. (2013). Quality characteristics of yoghurt enriched with Spirulina powder. *Mysore Journal of Agricultural Sciences*, *47*(2), 354-359.

Punampalam, R., Khoo, K. S., & Sit, N. W. (2018). Evaluation of antioxidant properties of phycobiliproteins and phenolic compounds extracted from Bangia atropurpurea. *Malays. J. Fundam. Appl. Sci*, *14*, 289-297.

Puyfoulhoux, G., Rouanet, J. M., Besançon, P., Baroux, B., Baccou, J. C., & Caporiccio, B. (2001). Iron availability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *J Agric Food Chem*, *49*(3), 1625-1629. https://doi.org/10.1021/jf001193c

Rezaei, M., Yahyaei, M., Parviz, M., & Khodaei motlagh, M. (2014). A Survey of microbial contamination in Traditional Cheese distributed in Markazi Province in 2010 [Research]. *Iranian Journal of Health and Environment*, *7*(1), 115-122. http://ijhe.tums.ac.ir/article-1-5326-en.html (in Persian)

Ritota, M., & Manzi, P. (2020). Rapid Determination of Total Tryptophan in Yoghurt by Ultra High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Molecules*, *25*(21). https://doi.org/10.3390/molecules25215025

Romay, C., González, R., Ledón, N., Remirez, D., & Rimbau, V. (2003). C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr Protein Pept Sci*, *4*(3), 207-216. https://doi.org/10.2174/1389203033487216

Sajilata, M. G., Singhal, R. S., & Kamat, M. Y. (2008). Supercritical CO2 extraction of γ-linolenic acid (GLA) from Spirulina platensis ARM 740 using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, *84*(2), 321-326. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.05.028

Salek Moghadam, A. R., Foruhesh Tehrani, H., Anssari, H., Ravadgar, B., Noorani Vatani, A., & Ghassemi, M. (2001). A survey on bacterial contamination on one-hundred unpasteurized cheese samples and pasteurized cheese as control and stability of commonly contaminating bacteria to different salt concentration [Research]. *Razi Journal of Medical Sciences*, *8*(25), 293-299. http://rjms.iums.ac.ir/article-1-346-en.html (in Persian)

Selvam, R., Subramanian, L., Gayathri, R., & Angayarkanni, N. (1995). The anti-oxidant activity of turmeric (Curcuma longa). *Journal of Ethnopharmacology*, *47*(2), 59-67. https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01250-H

Serlahwati, D., Farida, Y., & Asriana, Y. (2009). Penetapan Kadar β-karoten dalam Buah Parika Merah, Kuning dan Hijau (Capsicum annum Var. annum L.) Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Jurnal). Jakarta: Fakultas Farmasi Univesitas Pancasila.*

Shadan, M., & Khoshabi, F. (2003). A Survey on Microbial Contamination on Traditional Cheeses in Zahedan Province. *Zahedan. J Res Med Sci*, *4*(1), 33-41. (in Persian)

Shalaby, E. A., Shanab, S. M., & Singh, V. (2010). Salt stress enhancement of antioxidant and antiviral efficiency of Spirulina platensis. *J Med Plants Res*, *4*(24), 2622-2632.

Sinanoglu, O., Yener, A. N., Ekici, S., Midi, A., & Aksungar, F. B. (2012). The Protective Effects of Spirulina in Cyclophosphamide Induced Nephrotoxicity and Urotoxicity in Rats. *Urology*, *80*(6), 1392.e1391-1392.e1396. https://doi.org/10.1016/j.urology.2012.06.053

Singh, R. K., Tiwari, S. P., Rai, A. K., & Mohapatra, T. M. (2011). Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *The Journal of Antibiotics*, *64*(6), 401-412. https://doi.org/10.1038/ja.2011.21

Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, *18*(4), 463-470. https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0415

Staughton, J. (2020, January). *20 Best Foods for Healthy Weight Gain*. Organic Information Services Pvt Ltd. Retrieved January 31, 2020 from https://www.organicfacts.net/home-remedies/20-foods-for-healthy-weight-gain.html

Terpou, A., Bosnea, L., Mataragkas, M., & Markou, G. (2021). Influence of Incorporated Arthrospira (Spirulina) platensis on the Growth of Microflora and Physicochemical Properties of Feta-Type Cheese as Functional Food. *Proceedings*, *70*(1), 97. https://doi.org/10.3390/foods_2020-07659

Thillairajasekar, K., Duraipandiyan, V., Perumal, P., & Ignacimuthu, S. (2009). Antimicrobial activity of Trichodesmium erythraeum (Ehr) (microalga) from South East coast of Tamil Nadu, India. *International Journal of Integrative Biology*, *5*, 167-170.

Trmčić, A., Chauhan, K., Kent, D. J., Ralyea, R. D., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2016). Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. *Journal of dairy Science*, *99*(8), 6105-6120. https://doi.org/10.3168/jds.2016-11112

Varga, L., Szigeti, J., Kovács, R., Földes, T., & Buti, S. (2002). Influence of a Spirulina platensis Biomass on the Microflora of Fermented ABT Milks During Storage (R1). *Journal of dairy Science*, *85*(5), 1031-1038. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74163-5

Vonshak, A. (1990). Recent advances in microalgal biotechnology. *Biotechnology Advances*, *8*(4), 709-727. https://doi.org/10.1016/0734-9750(90)91993-Q

Winarni Agustini, T., Farid Maâ€™ruf, W., Widayat, W., Suzery, M., Hadiyanto, H., & Benjakul, S. (2016). Application of spirulina platensis on ice cream and soft cheese with respect to their nutritional and sensory perspectives. *Jurnal Teknologi*, *78*(4-2). https://doi.org/10.11113/jt.v78.8216

Yan, M., Liu, B., Jiao, X., & Qin, S. (2014). Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. *Food and bioproducts processing*, *92*(1), 89-97. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.07.008

Younis, M. O., Baka, Z., Abo-Doubara, M., El-Metwaly, M., & Mostafa, A. (2020). Utilization of cyanobacteria extracts in improving the microbial quality of soft white cheese. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, *11*(7), 223-228. https://doi.org/10.21608/jacb.2020.108790

Yousefi Mashouf , R. (2002). Brucella and coliform organisms in fresh cheese produced in hamadan–2000. *Journal of Research in Medical Sciences (JRMS)*, *6*(4), 348-349. https://sid.ir/paper/26474/en

Study of the Effect of Phycocyanin Pigment on Physicochemical, Sensory, Microbial and Antioxidant Properties of Cheese

Nikan Iri[1], **Bahareh Nowruzi**[1*], **Shokoofeh Ghazi**[2]

1- Department of Biotechnology, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
* Corresponding author (bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir)
2- Department of Microbiology, Faculty of New Sciences and Technologies, Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Due to its unique role, phycocyanin pigment extracted from the cyanobacterium *Spirulina platensis* can play an important role in enriching traditional cheeses. In this study, the amount of protein, fat, ash, moisture, β-carotene and pH of fortified cheese with different concentrations of phycocyanin pigment were determined. In addition, the counting of bacteria was done along with the assessment of antioxidant properties. Also, gas chromatography-mass spectrometer GC-MS test was performed to identify volatile compounds during 1, 3, 7, 14 and 21 days. The results of tests showed that the amount of fat, moisture, pH and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) of fortified cheeses has decreased significantly compared to the control. Also, the amount of protein, β-carotene, ferric reducing assay power (FRAP) and nitric oxide trapping increased significantly compared to the control. Sensory evaluation had also significant increase in satisfaction, except for the sense of smell compared to the control. In addition, no signs of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were found during different days. However, the presence of coliform bacteria was evident from 7 to 21 days in enriched and control cheeses. Also, the results of volatile compounds obtained from GC-MS test in control cheese and enriched cheese with 1% phycocyanin pigment show the presence of compounds with antimicrobial properties that played an important role in the shelf life and quality of cheese. It is hoped that the results of this study will be the basis for empowering the food industry in using pigments obtained from cyanobacteria.

Keywords: Antioxidative properties, Antioxidative activity, Microbial mass, Phycocyanin pigment, Sense assessment

© 2023, Research Institute of Food Science and Technology. All rights reserved.
This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0). To view a copy of this license, visit (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).